

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Příprava a purifikace isopentenyltransferas v rostlinném expresním systému**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Helena Ženožičková**  
Studijní program: R16130 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. David Zalabák, Ph.D.**  
Rok: 2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s uvedením citací všech použitých zdrojů literatury a dostupných cizojazyčných článků. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Jsem si vědoma toho, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne: .....

.....  
Podpis bakaláře

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Davidu Zalabákovi, Ph.D. za obětavý přístup a podnětné rady. Velké poděkování patří rovněž mé rodině, která mi byla velkou psychickou i materiální oporou. V závěru bych chtěla poděkovat také kolektivu Oddělení Molekulární biologie CRH, kde jsem tuto práci vypracovala. Práce byla podpořena projektem GAČR 18-23972Y.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Helena Ženožičková
Název práce	Příprava a purifikace isopentenyltransferas v rostlinném expresním systému
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Bakalářská práce se zaměřuje na hojně využívaný modelový organismus *Physcomitrella patens*, který se řadí mezi vývojově staré organismy s dominantní haploidní fází. Jedná se o mechorost, na jehož vývoji se výrazně podílí fytohormony, jako jsou cytokininy nebo auxiny. Právě biosyntéza cytokininů je u *P. patens* zprostředkována daleko častěji tRNA-IPT dráhou než adenylátovou dráhou, která je naopak častější u vyšších rostlin. Genom *Physcomitrella patens* obsahuje sedm genů kódujících enzym isopentenyltransferasu (IPT). V rámci této práce byly studovány čtyři vybrané geny kódující tyto enzymy. Jako součást experimentální práce bylo připravit vhodné binární vektory nesoucí jednotlivé geny *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4* a *PpIPT6* označené pomocí reporterového genu *GFP*. Dále byla provedena transientní exprese PpIPT v rostlinném expresním systému *Nicotiana benthamiana*.

**Klíčová slova** cytokininy, isopentenyltransferasy, biosyntéza cytokininů, infiltrace listů, western-blot, GFP, epifluorescenční mikroskopie, *Physcomitrella patens*, *Nicotiana benthamiana*, vektor, tRNA-IPT a adenylátová dráha

Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Helena Ženožičková
Title	Heterologous expression of isopentenyl transferases <i>in planta</i> .
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Molecular Biology, Center of the Region Haná for Biotechnology and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

The bachelor thesis focuses on the model organism *Physcomitrella patens*, which is one of the evolutionary old organisms with the dominant haploid phase. Phytohormones, such as cytokinins or auxins, have been implicated in the development of *Physcomitrella patens*. In particular, cytokinin biosynthesis is mediated more frequently by the tRNA-IPT pathway in *P. patens* than by the adenylate pathway, which in turn is more common in higher plants. Genome of *Physcomitrella patens* encodes for seven isoforms of isopentenyl transferase (IPT). Four IPT genes were studied in the framework of this work. In experimental part four binary vectors carrying *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4* and *PpIPT6* genes fused with reporter gene *GFP* were prepared. Four PpIPT proteins were transiently expressed *in planta* (*Nicotiana benthamiana*).

**Keywords** cytokinins, isopentenyl transferases, cytokinin biosynthesis, leaf infiltration, western-blotting, GFP, epifluorescence microscopy, *Physcomitrella patens*, *Nicotiana benthamiana*, vector, tRNA-IPT and adenylate pathway

Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>12</b>
2.1 Rostlinné cytokinininy .....	12
2.1.1 Charakteristika a objev cytokininů .....	12
2.1.2 Členění a chemická struktura cytokininů .....	12
2.1.3 Funkce cytokininů v rostlinách.....	13
2.1.4 Biosyntéza cytokininů .....	14
2.1.4.1 Přímá <i>de novo</i> biosyntetická dráha .....	15
2.1.4.2 Nepřímá biosyntetická dráha.....	16
2.1.6 Degradace cytokininů.....	18
2.2 Modelový organismus <i>Physcomitrella patens</i> .....	20
2.2.1 Životní cyklus .....	22
2.2.2 Transformace <i>Physcomitrella patens</i> .....	23
2.2.3 Použití selekčních kazet, promoterů a reportérových genů.....	23
2.3 Isopentenyltransferasy .....	25
2.3.1 IPT z modelové rostliny <i>Physcomitrella patens</i> .....	25
2.3.2 IPT z modelové rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
2.4. <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	27
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
3.1 Materiál .....	28
3.1.1 Přístroje .....	28
3.1.2 Komerční soupravy .....	29
3.1.3 Chemikálie.....	29
3.1.4 Média.....	30
3.1.4.1 Antibiotika.....	30
3.1.5 Materiál pro agarosovou elektroforézu .....	30
3.1.6 Roztoky pro SDS-PAGE a Western-blot s imunodetekcí .....	30
3.1.6.1 Protilátky .....	31
3.1.7 Vektory .....	31
3.1.8 Enzymy.....	33
3.1.8.1 Restrikční endonukleasy .....	33
3.1.8.2 Ostatní.....	33
3.1.9 Klonovací pufrý .....	33
3.1.10 Primery (Sigma-Aldrich, Německo) .....	33
3.1.11 Biologický materiál.....	34
3.1.12 Software.....	34
3.2 Metody .....	35
3.2.1 Příprava mikroorganismů .....	35
3.2.1.1 Kultivace .....	35
3.2.1.2 Skladování.....	35
3.2.2 Metody používané při práci s DNA .....	35
3.2.2.1 Transformace buněk <i>Agrobacteria tumefaciens</i> GV3101 .....	35
3.2.2.2 Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> TOP10 .....	36
3.2.2.2 Izolace plasmidů s použitím QIAprep Spin Miniprep Kit .....	36
3.2.2.3 Purifikace PCR produktů pomocí soupravy NucleoSpin Gel and PCR clean-up .....	36
3.2.2.4 Měření optické hustoty bakteriální kultury .....	37
3.2.2.5 Agarosová elektroforéza .....	37



3.2.2.6 SDS-PAGE elektroforéza .....	37
3.2.2.7 Analýza Western-blot .....	38
3.2.2.8 Amplifikace genu metodou PCR .....	38
3.2.2.9 Restrikce PCR produktů .....	39
3.2.2.10 Ligace .....	40
3.2.2.11 Colony PCR screening .....	41
3.2.2.12 Kontrolní restrikce .....	41
3.2.2.13 LR reakce .....	42
3.2.2.14 Sekvence .....	42
3.2.3 Příprava bakteriálních konzerv .....	43
3.2.4 Infiltrace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	43
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
4.1. Transientní exprese PpIPT v listech <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	45
4.2. Analýza proteinů metodou Western-blot .....	46
4.3. Klonování konstruktů 35S:PpIPT-GFP .....	48
<b>5 ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
<b>6 SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>54</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>58</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Vypracovat literární rešerši na téma: Biosyntéza cytokininů v nižších rostlinách se zaměřením na *Physcomitrella patens*.

### **Experimentální část**

Provést kultivaci a přípravu pokusných rostlin tabáku *Nicotiana benthamiana* a *Agrobacterium tumefaciens* nesoucího konstrukty pro expresi PpIPT pomocí infiltrace listů tabáku *Agrobacteriem* za účelem extrakce a analýzy proteinů metodou Western blot s anti-Myc a anti-His protilátkou.

Zpracovat výsledky a sepsat experimentální část bakalářské práce.

# 1 ÚVOD

*Physcomitrella patens* patří mezi hojně využívané modelové organismy již několik let, přesto v posledních letech vzrost jeho význam při použití v oblasti rostlinného výzkumu. Jedná se o fylogeneticky starý organismus. Pro nás je u *P. patens* důležitá zejména jeho haploidní vývojová fáze a schopnost homologní rekombinace, a to zejména kvůli využití v oblasti výzkumu. Růst mechorostu je výrazně ovlivňován přítomností fytohormonů, jako jsou auxiny, cytokininy (oddalují senescenci rostlin) nebo kyselina abscisová. Důležitá je pro jeho funkci rovněž přítomnost genů kódujících enzymy IPT (isopentenyltransferasy, EC 2.5.1.8), kterých je v genomu *P. patens* sedm. Nejvyšší význam má ovšem hlavně gen *PpIPT1*, který se podílí na tvorbě pupenů a celkovém vzrůstu mechorostu. Jeho absence v genomu má za následek sníženou tvorbu tRNA-vázaných cytokininů, mezi které se řadí zejména *cis*-zeatin, ve prospěch tvorby vyššího množství volných isopentenyladeninových cytokininů včetně *trans*-zeatinu. Biosyntéza cytokininů může u *Physcomitrella patens* probíhat prostřednictvím tRNA-zprostředkované dráhy nebo adenylát-zprostředkované dráhy, přičemž z dosavadních výzkumů vyplývá, že nepřímá tRNA-zprostředkovaná dráha je při biosyntéze dominantní. Abychom si mohli být jisti, jaký význam v oblasti biosyntézy cytokininů rostlin může mít zbylých šest genů kódujících IPT, je důležité geny detailně prozkoumat.

V teoretické části bakalářské práce je zpracována literární rešerše týkající se biosyntézy cytokininů v nižších rostlinách jako je *Physcomitrella patens* a zároveň pojednání o modelovém organismu tabáku *Nicotiana benthamiana*, který se dnes hojně využívá k ověření exprese genů metodou bakteriální infiltrace listů pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

Experimentální část je zaměřena na přípravu binárních konstruktů pro transformaci rostlin *Nicotiana benthamiana*, kdy byl jako vhodný reportérový gen použit gen kódující zelený fluorescenční protein (GFP) ve vektoru pENTR2B.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rostlinné cytokininy

#### 2.1.1 Charakteristika a objev cytokininů

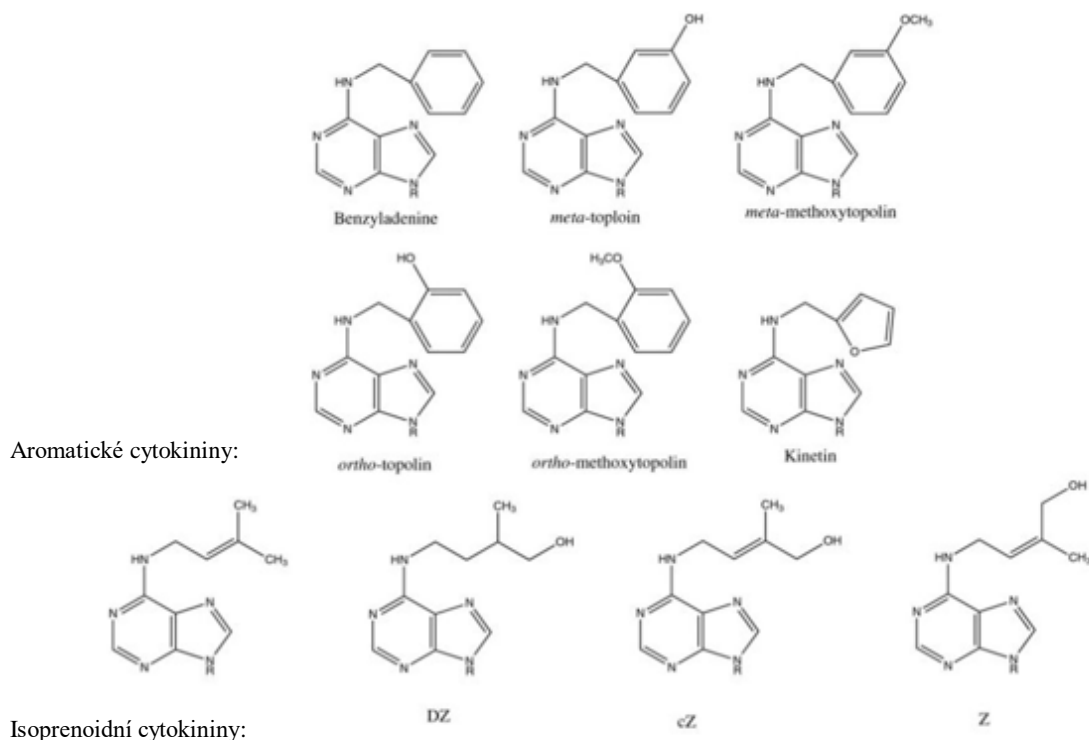
Cytokininy jsou jednou z pěti hlavních skupin endogenních růstových regulátorů známých také jako rostlinné hormony (fytohormony). Cytokininy dostaly svůj název na základě jejich schopnosti podpořit buněčné dělení (Macháčková, 1998). Každý z fytohormonů může mít vliv na více procesů, proto se řadí fytohormony mezi méně specifické v porovnání s živočišnými hormony. Cytokininy se v rostlinných pletivech nacházejí v koncentracích  $10^{-15}$  až  $10^{-8}$  mol·l<sup>-1</sup>. Mezi cytokininy řadíme jak přirozeně se vyskytující, tak i uměle syntetizované látky (Frébort *et al.*, 2011; Tarkowski *et al.*, 2004).

Rok 1955 je považován za rok objevení prvního cytokininu pod chemickým názvem 6-furfuryladenin. Tento cytokinin, známý jako kinetin byl nalezen v autoklávované DNA sledě (Barciszewski *et al.*, 1996; Frébort *et al.*, 2011). O několik desítek let později byl tento objev vysvětlován, jako produkt umělého přesmyku vyvolaného v důsledku autoklávování (Barciszewski *et al.*, 1996; Frébort *et al.*, 2011). Zároveň bylo prokázáno, že kinetin nepatří mezi fytohormony přirozeně se vyskytující v rostlinných pletivech, nicméně jeho funkce coby regulátoru rostlinného růstu se potvrdila. Po několika letech od objevení kinetinu došli vědci k závěru, že látka obsažená v extraktu z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*) vykazuje stejné biologické účinky jako kinetin. Tato látka byla identifikována jako trans-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino) purin a pojmenována jako zeatin. Název zeatin vychází z latinského názvu rostliny, z níž byla molekula izolována (Letham, 1973). V současné době je známo více jak 30 přirozených nebo uměle připravených cytokininů.

#### 2.1.2 Členění a chemická struktura cytokininů

Přirozené cytokininy jsou N<sup>6</sup> deriváty adeninu, zatímco většina syntetických cytokininů patří mezi deriváty močoviny a thiomčoviny (Frébort *et al.*, 2011; Tarkowski *et al.*, 2004). Na základě rozdílné konfigurace na N<sup>6</sup> postranním řetězci adeninového typu dělíme cytokininy na isoprenoidní a aromatické. Mezi isoprenoidní patří například *cis* a *trans* izomery zeatinu (*cZ*, *tZ*), dihydrozeatin (DZ), N<sup>6</sup>-(-2-isopentenyl)-adenin (iP) a jiné (Sakakibara, 2006). Do aromatických spadají například benzyladenin (BA) nebo topoliny: *ortho*-topolin (*oT*), *meta*-topolin (*mT*), *meta*-ethoxytopolin (*meoT*) nebo

*ortho*-methoxytopolin (*memT*) (Strnad, 1997). Rozšířenějšími cytokininy v rostlinách jsou ty s isoprenoidní strukturou (Sakakibara, 2006) (Obr. 1).



Obr. 1 Struktury kinetinu a aromatických a isoprenoidních cytokininů (převzato z: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-8-42>)

### 2.1.3 Funkce cytokininů v rostlinách

Nejprve se předpokládalo, že syntéza cytokininů probíhá v kořenech, ale pozdější výzkum prokázal, že cytokininy v závislosti na druhu rostliny mohou být syntetizovány v různých částech rostlin (Letham, 1994). Například v rostlině *Arabidopsis thaliana* jsou geny kódující proteiny, které syntetizují cytokininy, exprimovány v kořenech, listech, stonku a květu (Kamínek, 1982).

V případě posuzování biologické funkce cytokininů musíme zohlednit několik hledisek, a to vliv vývojové fáze rostliny nebo environmentálních podmínek včetně aktivních a neaktivních forem cytokininů. Zároveň je nutné brát v úvahu účinek cytokininů v jednotlivých částech rostlin, protože v případě posuzování funkcí nehledíme na rostlinu jako na celek (Kamínek, 1982).

Velmi podstatnou úlohu v rostlinách plní zejména cytokininy, které se významně podílí na diferenciaci a množení buněk (Sakakibara, 2006). Svoji úlohu hrají cytokininy také v procesu stárnutí rostlin (Gan a Amasino, 1995), transportu živin (Eckardt, 2003),

utváření a činnosti apikálních meristémů (Jung *et al.*, 2005), v apikální dormanci (Dun *et al.*, 2006) či klíčivosti semen (Riefler *et al.*, 2006) nebo oddalují senescenci rostliny.

Důležitost cytokininů ve vývoji rostlin byla jasně demonstrována experimenty s cytokininoxidase, klíčovým enzymem katabolismu cytokininů. Vlivem nadexprese cytokininoxidasy v tabáku dochází ke snížení hladiny endogenních cytokininů, a tedy k omezení vývoje nadzemní části rostlin zapříčiněné zpomalením proliferace v stonkovém apikálním meristému. Tento fakt zároveň potvrzuje vliv endogenních cytokininů na buněčné dělení *in vivo* (Werner *et al.*, 2001). Pokud se u rostliny *Arabidopsis thaliana* projeví nadměrná exprese cytokininoxidasy, dojde k nadměrnému vývoji kořenového systému, což vede k hypotéze, že cytokininy mají opačný vliv na řízení buněčné proliferace v oblastech stonkových nebo kořenových meristémů (Taiz a Zeiger, 2006). Tvorba kalusového pletiva je závislá na poměru zastoupení auxinů vůči cytokininům přítomným v kultivačním médiu. Pokud je zastoupení auxinů vůči cytokininům nižší, dochází k tvorbě prýtu, naopak zvýšené zastoupení auxinů k cytokininům podporuje tvorbu kořenů (Skoog a Miller, 1965; Miyawaki *et al.*, 2003).

#### **2.1.4 Biosyntéza cytokininů**

Zásadní vliv na rychlost biosyntézy isoprenoidních cytokininů v rostlinách mají isopentenyltransferasy (IPT). V závislosti na původu nukleotidového substrátu rozlišujeme v rostlinách dvě rozdílné formy IPT (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009).

První formou IPT jsou adenylátové isopentenyltransferasy (EC 2.5.1.27) využívající jako substráty adenosintrifosfát (ATP), adenosindifosfát (ADP) nebo adenosinmonofosfát (AMP) a jsou u kvetoucích rostlin kódovány v několika genových kopiích (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001). Adenylátové IPT rostliny *Arabidopsis* jsou zodpovědné zejména za syntézu iP a tZ typu cytokininů (Miyawaki *et al.*, 2006). První popsaná adenylátová IPT byla vyklonovaná z rostlinného patogenu *Agrobacterium tumefaciens* (Barry *et al.*, 1984; Lichtenstein *et al.*, 1984). Byla rovněž prokázána její funkčnost v mechorostu *Physcomitrella patens* (Reutter *et al.*, 1998).

Degradace tRNA byla navržena jako zdroj cytokininu, protože některé tRNA molekuly obsahují isopentenyloadenosinová (iPA) residua na místě sousedícím s antikodonem. Modifikace je katalyzována právě druhou formou enzymu IPT, a to tRNA-IPT, které nalezneme v řadě jak prokaryotních, tak i eukaryotních organismů

jako je např. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Homo sapiens* a *Zea mays*. Zajímavou skutečností je, že se tyto geny nenacházejí v Archeobakteriích (Takei, Sakakibara a Sugiyama, 2001). Enzymy tRNA-IPT (tRNA-IPT, EC 2.5.1.8) katalyzují přidavek dimethylallyldifosfátu (DMAPP) k vazebnému tRNA adeninovému nukleotidu. (Murai, 1994; Miyawaki *et al.*, 2006). V rostlině *Arabidopsis* jsou tRNA-IPT zodpovědné za výhradní biosyntézu *cis*-zeatinu (Miyawaki *et al.*, 2006).

Kvůli množství spotřebované tRNA je zřejmé, že hlavní rozkladný proces, tedy tRNA-IPT zprostředkovaná dráha, není hlavním zdrojem cytokininu v rostlinách. Daleko běžnější cestou tvorby cytokininů je takzvaná *de novo* adenylát zprostředkovaná dráha (Takei, Sakakibara a Sugiyama, 2001).

Biosyntéza isoprenoidních cytokininů je zahájena prenylací adenosin-5'-fosfátů na N<sup>6</sup> konci reakcí s hydroxymethylbutenyl difosfátem (HMBDP) nebo dimethylallyldifosfátem (DMAPP) katalyzované enzymem adenosin fosfátisopentenyl transferasou (IPT, EC 2.5.1.27) (Takei *et al.*, 2001). Poprvé byl enzym IPT charakterizován u tumorogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984). U *Agrobacteria* se vyskytují dva IPT geny označované jako *Tmr* a *Tzs* vyskytující se oba v oblasti Ti-plasmidu. Gen *Tmr* je uložen v T-DNA kompartmentu Ti-plasmidu naopak gen *Tzs* v jeho virulentní oblasti usnadňující přenos T-DNA (John *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 1988). Jediným substrátem, který jsou enzymy *Tzs* a *Tmr* schopny zpracovat je adenosinmonofosfát (AMP). Kvůli nízké stabilitě a nízkému obsahu isopentenyltransferasy nebylo dlouho možné podat komplexní informaci o rostlinné isopentenyltransferase, a proto byla podrobena několika experimentům. (Takei *et al.*, 2001).

#### **2.1.4.1 Přímá *de novo* biosyntetická dráha**

Iničiačním krokem v přímé neboli *de novo* biosyntéze ve vyšších rostlinách je tvorba isopentenyadenosin-5'-monofosfátu (iPMP) z AMP a dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP), který je katalyzován adenylátovou isopentenyl transferázou (Takei, Sakakibara a Sugiyama, 2001). U *Arabidopsis thaliana* zodpovídají adenylátové isopentenyltransferázy za syntézu cytokininů, jako je *tZ* nebo *iP* (Miyawaki *et al.*, 2006).

Jako první se adenylátová IPT objevila u fytopatogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kde byla zároveň prokázána její funkčnost po provedení transformace mechorostu *Physcomitrella patens* za použití mutanta mechu, jehož defekt spočíval v pučení, které jak již bylo zmíněno, souvisí s činností cytokininů. (Reutter *et al.*, 1998) Bylo zjištěno, že genom *Arabidopsis thaliana* kóduje sedm IPT genů (*AtIPT1*, 3, 4, 5, 6, 7 a 8) patřících k adenylát zprostředkovaným IPT a dva tRNA IPT geny (*AtIPT2* a 9) (Miyawaki *et al.*, 2006). Geny *AtIPT1*, 3, 5 a 7 jsou exprimovány v růstových orgánech rostlin jako jsou kořen, stonek nebo listy. Nejvíce jsou izoenzymy *AtIPT4* a 8 exprimovány v nezralých semenech nebo dále v reprodukčních orgánech (Miyawaki *et al.*, 2004). U všech adenylátových IPT vyjma *AtIPT6* bylo při jejich nadexpresi možno pozorovat zvýšení produkce iP derivátů (Sakakibara *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2003), což lze považovat za důkaz, že u rostliny *Arabidopsis thaliana* je dominantní *de novo* zprostředkovaná dráha biosyntézy cytokininů na rozdíl od tRNA-zprostředkované nepřímé dráhy (Miyawaki *et al.*, 2006). Tvorba cytokininu *tZ* stejně jako jeho derivátů závisí na hydroxylaci postranního řetězce iPR a je katalyzována specifickými cytochrom P450 monooxygenasami (CYP450, EC 1.14.14.1) (Takei *et al.*, 2004).

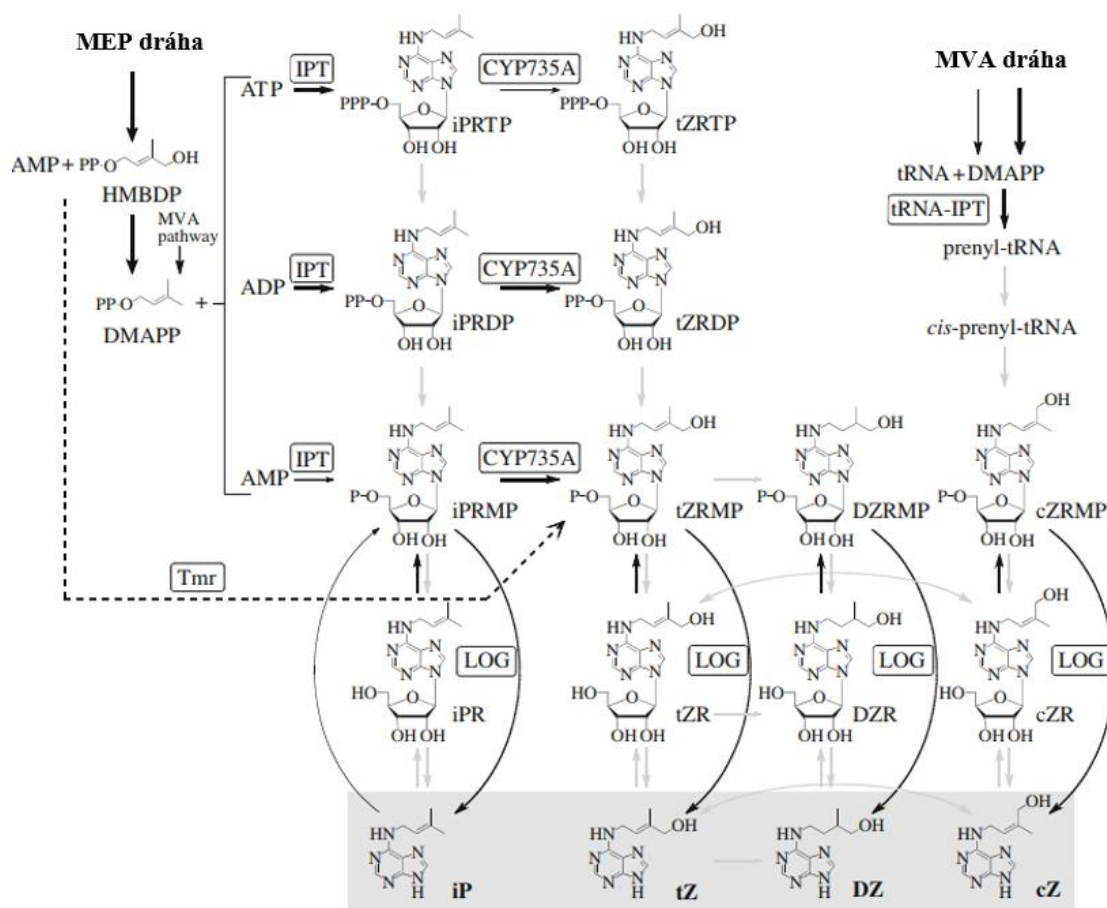
#### **2.1.4.2 Nepřímá biosyntetická dráha**

Nepřímá biosyntéza cytokininů je katalyzována tRNA isopentenyltransferasou a je zahájena prenylací tRNA molekul (tRNA-IPT; EC 2.5.1.75) (Miyawaki *et al.*, 2006; Mok a Mok, 1994). Nejprve se předpokládalo, že degradace tRNA by mohla být velkým zdrojem volných cytokininů (Swaminathan, Bock, 1977), což bylo vzápětí vyvráceno díky výpočtům rychlosti obratu tRNA, které ukázaly, že se biosyntéza neobejde bez *de novo* biosyntetické dráhy (Klämbt *et al.*, 1992). Studie o metabolismu cytokininů isopentenylového typu (Miura a Miller, 1969; Miura a Hall, 1973) vedly k hypotéze, že iPMP je také primárním meziproduktem cytokininů v rostlinách a cytokininy zeatinového typu jsou tvořeny hydroxylací iPMP a jeho derivátů (Chen, 1982; Letham a Palni, 1983).

K tvorbě cytokininu *cis*-zeatinu pak dochází právě díky nepřímé tRNA zprostředkované dráze, katalyzované enzymem tRNA-IPT (Sakakibara, 2006). DMAPP a HMBDP jsou prekurzory tvorby postranního řetězce u isoprenoidního typu cytokininů. Zajímavé je, že jeden z hlavních enzymů *AtIPT1* katalyzující tvorbu cytokininů v rostlině *Arabidopsis thaliana* HMBDP jako substrát nevyužívá



(Sakakibara *et al.*, 2005). Výše zmíněné prekurzory mohou být syntetizovány dvěma drahami, a to přímou methylerythritol fosfátovou dráhou (MEP) nebo nepřímou mevalonátovou dráhou (MVA). Obě biosyntetické dráhy, a to jak MEP dráhu pobíhající v plastidech, jejímiž finálními produkty jsou *tZ* nebo *iP*, i MVA dráhu probíhající v endoplazmatickém retikulu a cytosolu za tvorby *cZ* (Kakimoto, 2001) zachycuje Obr. 2.



Obr. 2 Model zachycující obě biosyntetické dráhy isoprenoidních cytokininů probíhající v rostlinných buňkách infikovaných *A. tumefaciens* a intaktních rostlinných buňkách. MEP dráha přispívá k tvorbě isoprenoidních řetězců *iP* a *tZ* a MVA dráha vede k tvorbě *cZ*. Enzym IPT katalyzuje ve vyšších rostlinách tvorbu cytokininů. V průběhu N-prenylace se využívá substrátu DMAPP za tvorby *iPRTP* a *iPRDP*. Přeměnu *iP* nukleotidu katalyzuje CYP735A za tvorby *tZ*. Tmr v infikovaných buňkách *A. tumefaciens* zprostředkovává prenylací AMP pomocí HMBDP, za produkce *tZRMP*. tRNA-IPT katalyzuje N-prenylaci tRNA za tvorby *cZRMP*. Enzym LOG přeměňuje neaktivní formy cytokinin monofosfátů na aktivní volné báze. Cis-trans isomerasa reverzibilně přeměňuje *tZ* na *cZ*. (převzato a upraveno podle: Kamada-Nobusada, 2009).

### 2.1.6 Degradace cytokininů

Cytokinin dehydrogenasa způsobuje ireverzibilní degradaci cytokininů. Oxidační štěpení cytokininů bylo poprvé prokázáno v tabákové kultuře roku 1971 (Brownlee *et al.*, 1975). O tři roky později byl enzym pojmenován jako cytokininoxidasa vědci Whittym a Hallem. K degradaci cytokininů dochází díky oxidačnímu štěpení jeho postranního řetězce na pozici N<sup>6</sup> adeninového kruhu, což vede k tvorbě adeninu, respektive jeho derivátů a aldehydu odvozeného z postranního řetězce (Brownlee *et al.*, 1975). Dehydrogenací cytokininů vzniká iminový meziprodukt tak, že elektronový akceptor přijme dva elektrony z redukováného enzymového kofaktoru FADH<sub>2</sub>. Zpočátku se mělo za to, že právě molekulární kyslík je nutný pro aktivitu cytokininových enzymů (CKX), ale více efektivní jsou zejména akceptory elektronů typu chinonu. Jedním z příkladů je 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon (Galuszka *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004). Kvůli výše zmíněné reakci došlo k reklasifikaci enzymu z oxidasy na dehydrogenasu (CKX, EC 1.5.99.12).

Kukuřičná *ZmCKX1*, je lokalizována v aleuronové vrstvě zrna a v menší míře i ve floemových buňkách ve stoncích (Galuszka *et al.*, 2005).

Produktem oxidačního štěpení 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-onu (DIMBOA) vyskytujícího se v kukuřičných pletivech je 4-nitrosoresorcinol-1-monomethylether, který může sloužit jako přirozený akceptor elektronů CKX (Frébortová *et al.*, 2010).

Jediným známým enzymem, u něhož byla potvrzena funkce katalýzy ireverzibilní inaktivace cytokininů je CKX. Kromě rostlin je významný rovněž svojí aktivitou v několika nižších organismech jako je například mech *Funaria hygrometrica* (Gerhauser a Bopp, 1990) nebo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Van Kast a Laten, 1987). U kvasinky je ovšem přítomnost endogenního CKX nejistá (Schmülling *et al.*, 2003), jak se můžeme domnívat z vyhledávání BLAST, ve kterém nebyla nalezena sekvence odpovídající genu cytokinindehydrogenasy. Bohužel je velmi těžké čistý protein izolovat vzhledem k nízké koncentraci CKX v rostlinných pletivech. Zásadní zlom nastal po provedení klonování genu pro CKX z kukuřice (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999). Tento fakt umožnil identifikaci CKX genů v odlišných druzích a následně jejich expresi v heterologních hostitelích nebo nadexpresi v rostlinách. Pro správné fungování rostlinných enzymů CKX je nutná přítomnost FAD molekuly, která musí být kovalentně vázaná. Kovalentní vazba kofaktoru na protein

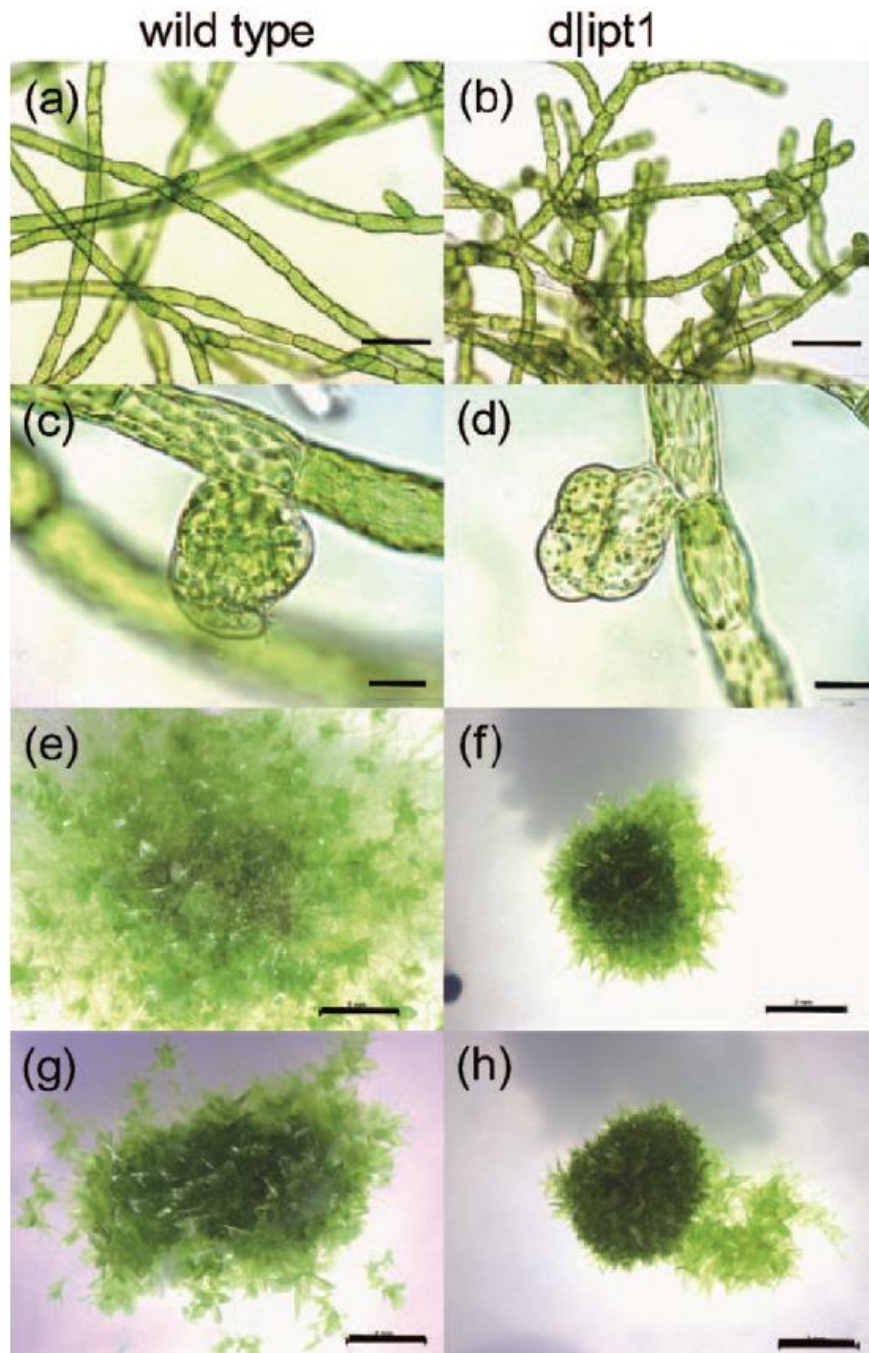
posiluje oxidační sílu flavinu a redoxní katalýzu (Galuszka *et al.*, 2008). FAD může být navázán na histidinový zbytek GHS motivu v N-terminální části enzymu prostřednictvím 8-methylskupiny isoalloxazinového kruhu (Malito *et al.*, 2004). CKX enzymy jsou tvořeny dvěma doménami pro vazbu substrátu a kofaktoru (FAD). Skoro jedna třetina všech aminokyselin je vysoce konzervovaná mezi různými CKX proteiny, což může souviset s jejich schopností rozpoznat substrát a přenést elektrony (Schmülling *et al.*, 2003).

## 2.2 Modelový organismus *Physcomitrella patens*

*Physcomitrella patens* je vědecký název pro Čepenku odstálou patřící do řádu Funariales. Jedná se o mechorost, pro něhož je haploidní fáze životního cyklu dominantní a díky tomu jej můžeme považovat za ideální modelový organismus pro genetické studie (Cove, 2005). Může za to jejich citlivost na růstové látky a jednoduchost ve vývojové diferenciaci (Yevdakova *et al.*, 2008). Od roku 2007 je známa kompletní genomová sekvence *Physcomitrella patens* (Rensing *et al.*, 2008), která mimo jiné kóduje i hlavní enzymy metabolismu, degradace a signalizace cytokininů. Vývojově je *Physcomitrella patens* starší než semenné rostliny o více než 400 milionů let. Velký vliv na vývoj jednotlivých buněk mechů mají právě cytokininy, které u nich mohou indukovat přechod buněk z filamentózního růstu na trojrozměrný, což se projeví tvorbou gametoforů a pupenů (Brandes a Kende 1968).

Poslední studie prokázaly, že *Physcomitrella patens* vylučuje mnoho svých metabolitů do kultivačního média. Jednou ze zásadních složek metabolitů jsou i cytokininy, hlavně iP (Reutter *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2001; von Schwartzberg *et al.*, 2007). Zejména vyřazení genu *PpIPT1* (Obr. 3) mělo výrazný dopad na rozdíly v zastoupení jednotlivých typů cytokininů (Lindner *et al.*, 2014). Genom *Physcomitrella patens* nese sedm genů kódujících PpIPT, a to *PpIPT1-7* (Yevdakova a von Schwartzberg, 2007). U genů *PpIPT2*, 3 a 6 se doposud nepodařilo prokázat jejich aktivitu (Lindner *et al.*, 2014).

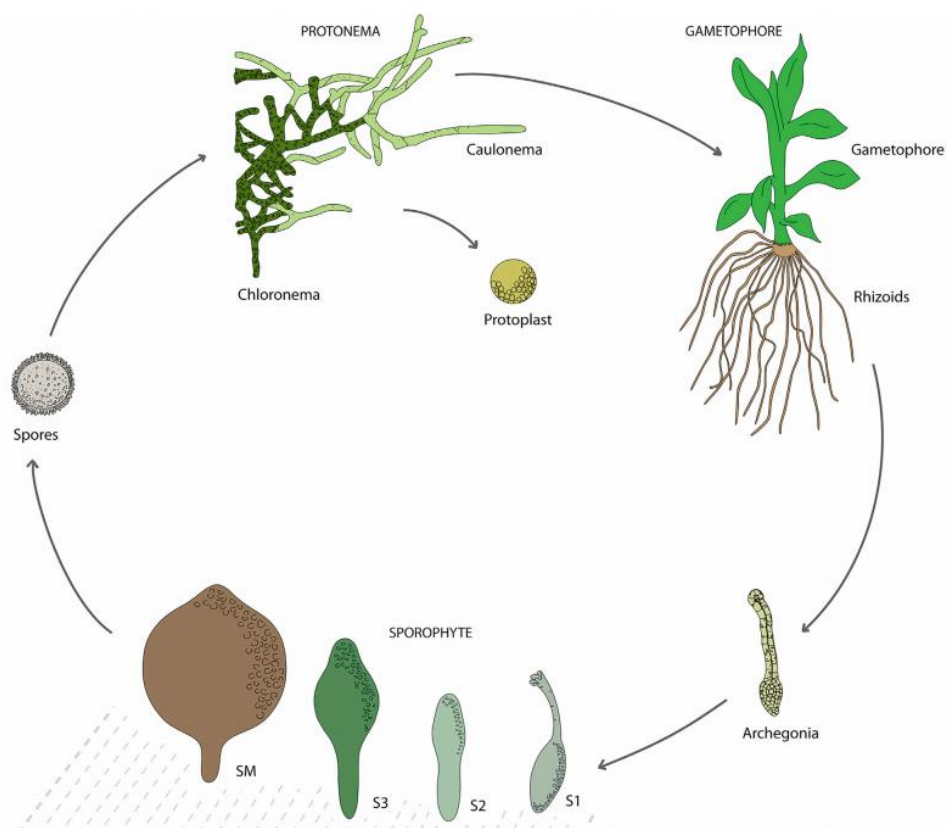
Mechorostu *P. patens* prospívají sterilizované komerční kompostové směsi, ve kterých může dobře růst a dochází v nich k nejrychlejšímu dokončení životního cyklu. V laboratorních podmínkách se standardně pěstuje buď na pevném, nebo i v tekutém kultivačním médiu (Knight *et al.*, 2002). Po překrytí kultivačního agarového média sterilním celofánovým filmem došlo k zjednodušení sklizně rostlinného materiálu tím, že nedochází k růstu rostlin do média (Grimsley *et al.*, 1977). Kmeny *Physcomitrella patens* mohou být dlouhodobě skladovány v mrazáku, nejčastěji v kapalném dusíku, který je schopný je zakonzervovat na několik let. Pokud kmen rozmrazíme, je nutno počítat s možnými problémy s regenerací materiálu, hlavně u mutantních kmenů.



Obr. 3 Fenotypový rozdíl mezi WT a mutantem mechorostu *Physcomitrella patens* s absencí genu *PpIPT1*. V sekcích (a), (c), (e) a (g) je vidět, že u přirozeně se vyskytujícího mechorostu je gen *PpIPT1* zodpovědný za větvení, tvorbu pupenů a celkový růst mechu, v porovnání se zónami (b), (d), (f) a (h), kde je vidět, že deficiencie genu *PpIPT1* negativně ovlivňuje tvorbu pupenů, které jsou malé, mech není rovněž tolik větvený a je zakrslého vzrůstu. (převzato z: Lindner *et al.*, 2014)

### 2.2.1 Životní cyklus

Mechorosty stejně jako kapradiny a semenné rostliny se vyznačují střídáním generací haploidní fáze produkující gamety s diploidní fází, jejímž produktem je haploidní spora vzniklá meiotickým dělením. Co je ovšem typické pouze pro mechorosty, je dominance haploidní fáze (Cove, 2005). Haploidním orgánem produkujícím samčí gamety jsou takzvaná antheridia, která jsou pohyblivá a mají bičíky. Samičí gamety jsou produkovány v zárodečnicku zvaném jako archeogonium. Jedná se o jednodomou rostlinu, kdy jeden gametofor produkuje zároveň samčí i samičí gamety. Pro oplodnění je důležité zachovat vlhké podmínky, aby se mohly spermatozoidy volně pohybovat. Z oplodněné zygoty (zárodku) se stává sporofyt (Cove, 2005). *Physcomitrella patens* je mech vyvíjející se začátkem léta z přezimujících spor. Roste poblíž řek, jezer nebo příkopů (Cove, 2005). Dle lokalit výskytu jsou spory produkovány od září do března. Pro správný průběh gametogeneze je vhodné dodržovat světelný režim v podobě 8 hodin tmy a 16 hodin světla při teplotě pohybující se pod 18 °C. Mech *Physcomitrella patens* se rovněž vyznačuje výbornou schopností regenerace.



Obr. 4 Zachycení životního cyklu modelového organismu *Physcomitrella patens* (převzato z: Ortiz-Ramírez *et al.*, 2016)

### 2.2.2 Transformace *Physcomitrella patens*

U *P. patens* byly nejprve vyvinuty genetické transformační techniky protoplastů využívající polyethylenglykol (PEG) (Schaefer *et al.*, 1991). Při transformaci mohou vznikat jak stabilní transformanty, kdy je plasmid integrován do jaderné DNA, tak i ke vzniku nestabilních transformantů, u kterých se plasmid neintegruje a replikuje se extrachromozomálně. Jak ukázala analýza metodou Southern-blot, tak transgeny se mohou integrovat v konkatemeru mezi 3 a 40 kopiemi, což může představovat formu, kterou se transgenní materiál replikuje (Ashton *et al.*, 2000). Exprese transgenů v nestabilních transformantech se omezuje na protonemální pletivo, a proto nemůže docházet k jeho detekci v gametoforech a ani k samotnému přenosu transgenů nedochází meiózou. Pro další třídu transformantů platí, že si při kultivaci na selektivním médiu zachovává transgenní DNA a to i v případě, kdy je selekce odstraněna. Takto vzniklé transformanty jsou stabilní, což potvrzuje i metoda Southern-blot, kterou se mimo jiné podařilo prokázat, že transgeny vložené do genomové DNA mohou existovat ve více kopiích vyskytujících se na jednom stejném lokusu (Schaefer *et al.*, 1994).

Mechorost *Physcomitrella patens* je rovněž možné transformovat také biolisticky a jedná se opět o postup generující přechodně stabilní a nestabilní transformanty (Sawahel *et al.*, 1992).

V posledních letech byly pro transformaci *P. patens* použity nové virulentní kmeny bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, které v porovnání s předchozími dvěma metodami transformace tvoří více stabilních transformantů (Šmídková *et al.*, 2010). Nicméně nejpoužívanější metodou transformace modelové rostliny *Physcomitrella patens* stále zůstává transformace protoplastů pomocí PEG.

### 2.2.3 Použití selekčních kazet, promoterů a reportérových genů

Nejčastější selekční kazetou využívanou k selekci transformantů mechu *Physcomitrella patens* je gen *NPTII* pod kontrolou *CaMV35S* promotoru viru mozaiky kvěťáku (Cauliflower Mosaic Virus 35S) ukončený terminátorem pro nopalinsynthetasu (tNOS) (Schaefer *et al.*, 1991). Gen *NPTII* je genem kódujícím a mimo jiné uděluje transgenní rostlině resistenci vůči Geneticinu. Dalšími antibiotiky využívanými k selekci jsou například Zeocin a Hygromycin. Pro stanovení promotorové aktivity se v současné době používají reportérové geny jako je *uidA* kódující p-glukuronidázu (Knight *et al.*, 1995). Z medúzy *Aequoria victoria* byl izolován gen kódující zelený fluorescenční protein

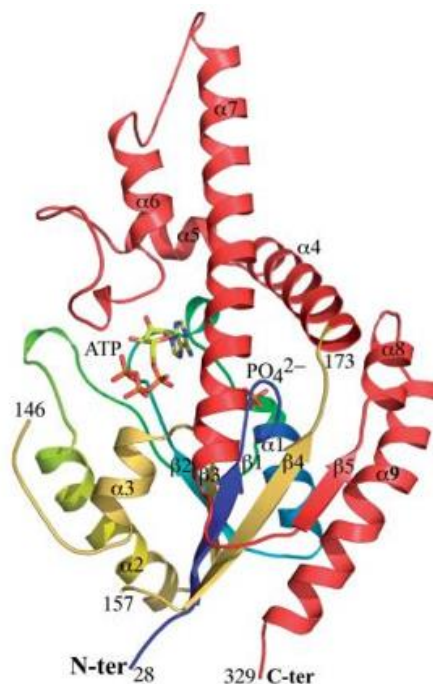
(Green Fluorescent Protein, GFP), který je vhodný pro expresi v mechorostu *P. patens*. Jelikož se nejedná o enzym, tak je potřeba vyšší hladina exprese (Bezanilla *et al.*, 2003). Pro srovnání aktivity promotoru se dnes používá gen luciferasy získaný ze světlušky *Photinus pyralis* (Horstmann *et al.*, 2004).



## 2.3 Isopentenyltransferasy

### 2.3.1 IPT z modelové rostliny *Physcomitrella patens*

Nadměrná produkce cytokininů způsobená transdukovanými IPT způsobuje abnormální buněčnou proliferaci. Gen byl identifikován v řadě bakteriálních druhů jako je právě *Physcomitrella patens* a jeho translační produkt byl prokázán v biosyntéze iPMP jako aktivní cytokinin tzv. *in vitro*. Na druhou stranu je tu malý konkrétní důkaz autentické biosyntézy iPMP pomocí IPT ve vyšších rostlinách. Cytokinin byl navržen k syntéze ve specifických lokalitách, jako je špička kořene, nezralá jádra nebo středový apikální meristém. Navzdory tomu aktivita rostlinné IPT byla pozorována v jen několika málo nezralých kukuřičných jádrech a cytokinin autonomním tabákovém kalusu. Jako enzym se zdá být vysoce nestálý a nízkého obsahu. V současné době je ovšem práce s tímto enzymem hlavním předmětem zájmu, kdy se vědci snaží exprimovat geny kódující enzym IPT. Jako první krok k porozumění biosyntetických drah cytokininů na molekulární úrovni byl pokus o identifikaci IPT genů v *Arabidopsis thaliana*. Studie ukázaly, že *Arabidopsis* obsahuje mnohonásobné množství IPT genů kódovaných malou multigenovou rodinou. Dle dostupných informací byl výše zmíněný fakt první zprávou o identifikaci IPT ve vyšších rostlinách na molekulární úrovni (Takei, Sakakibara a Sugiyama, 2001).



Obr. 5 Krystalická struktura rostlinné adenylyátové isopentenyltransferasy HIAIPT. (převzato z: Chu *et al.*, 2010)

### 2.3.2 IPT z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*

Roku 2003 byl japonskými vědci proveden výzkum genů ATP/ADP isopentenyltransferas v rostlině *Arabidopsis thaliana*. Každý gen byl exprimován v určitém typu rostlinné buňky. Analýza fúzních genů *GUD::AtIPT* potvrdila, že pletiva podílející se na expresi *AtIPTas* distribuují cytokininy celou rostlinou *Arabidopsis thaliana* (Miyawaki, Matsumoto-Kitano a Kakimoto, 2004).

Přenos isopentenylových skupin na AMP hraje důležitou roli v biosyntéze cytokininů (Chen 1997, McGaw a Burch 1995). V rostlině *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno devět potencionálních IPT sekvencí. Sedm z devíti produktů genů mají podobnou sekvenci (*AtIPT1*, *AtIPT3-8*) (Takei *et al.*, 2001).

## 2.4. *Nicotiana benthamiana*

V laboratorní praxi je *Nicotiana benthamiana* řazen mezi nejrozšířenější hostitele v rostlinné virologii. Kromě virů jsou schopny tuto rostlinu infikovat další patogenní agens jako například *Agrobacterium tumefaciens* patřící mezi bakterie nebo oomycety. Často je *N. benthamiana* předmětem výzkumu obranné signalizace a vrozené imunity (Goodin *et al.*, 2008). Doposud je známo 76 druhů patřících do rodu *Nicotiana* vyskytujících se zejména v tropických a subtropických oblastech na území čtyř kontinentů, z nichž nejčastější jsou Austrálie a jižní Amerika (Knapp *et al.*, 2004). Druhy *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana excelsior* jsou jediné dva druhy s 19 páry chromosomů (Burbidge, 1960).

*Nicotiana benthamiana* se dostal do povědomí jako modelový organismus až díky třem technickým pokrokům. Jako první se začalo využívat postupu umožňujícího expresi cizího genu neseného na vektoru z rostlinného viru nebo bakterie. Další vyvinutou technologií bylo virem-indukované umlčení genu (VIGS), které způsobovalo umlčení (snížení exprese) kteréhokoliv genu v rostlinách (Thomas *et al.*, 2001). Poslední technologií dnes hojně využívanou je agroinfiltrace. Typickým příkladem je exprese genu *PpIPT* díky bakterii *Agrobacterium tumefaciens* v listech *N. benthamiana* metodou infiltrace.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Přístroje

- ❖ Analytické váhy model 5034/120 (Auxilab, Španělsko)
- ❖ Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)
- ❖ Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- ❖ Centrifuga Heraeus Megafuge 40 (Thermo Scientific, USA)
- ❖ Digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)
- ❖ Dokumentační systém ChemiDoc MP (BIO-RAD, USA)
- ❖ Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)
- ❖ Elektroforetická komůrka na horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- ❖ Epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (Zeiss, Německo)
- ❖ Flowbox (MERCİ, ČR)
- ❖ Fytokomora (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- ❖ Gel Doc EZ image (BioRad, USA)
- ❖ Chlazená centrifuga Model 5417R (Eppendorf, Německo)
- ❖ Inkubátor (25 °C) (Lovibond, Německo)
- ❖ Inkubátor (37 °C) (Medline Scientific limited, Německo)
- ❖ Inkubátor COOL-Hotter Dry (Alex Red, Israel)
- ❖ Laminární box Faster SCS 2-6 (Ferra, Itálie)
- ❖ Magnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG (IKA, Německo)
- ❖ pH metr (Eutech Instruments, Singapur)
- ❖ Spektrofotometr NanoDrop One (Thermo Scientific, USA)
- ❖ Spektrofotometr NAS 99 (ACT gene, USA)
- ❖ Stolní pikofuga (Biosan, Litva)
- ❖ Termocycler Applied Biosystems Veriti (Life Technologies, USA)
- ❖ Termocykler T-gradient (Biometra, USA)
- ❖ Třepačka (Kühner, Švýcarsko)
- ❖ Třepačka inkubovaná Heidolph unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- ❖ Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)
- ❖ Vortex (Labnet, USA)

### 3.1.2 Komerční soupravy

- ❖ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Nizozemsko)
- ❖ NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit (Machery Nagel, Německo)

### 3.1.3 Chemikálie

- ❖ Acetosyringon (Sigma-Aldrich, USA)
- ❖ Agar (HiMedia, Indie)
- ❖ Agarosa (Amresco, USA)
- ❖ Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- ❖ Albumin, hovězí sérový (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- ❖ Amidočern 10 B (Merck, Německo)
- ❖  $\beta$ -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- ❖ Bromfenolová modř (Fluka – Sigma-Aldrich, USA)
- ❖ Butanol (Penta, Česká republika)
- ❖ Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka – Sigma-Aldrich, USA)
- ❖ Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, USA)
- ❖ Deionizovaná voda
- ❖ dNTP směs  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Fermentas, Litva)
- ❖ Dimethylsulfoxid (DMSO) (Duchefa, Nizozemsko)
- ❖ Ethanol (Penta, Česká republika)
- ❖ Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- ❖ Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)
- ❖ Hydroxid draselný (KOH) (Lach-Ner, Česká republika)
- ❖ Hygromycin B (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- ❖ Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Česká republika)
- ❖ Chlorid hořečnatý  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  ( $\text{MgCl}_2$ ) (Lach-Ner, Česká republika)
- ❖ Kvasinkový extrakt (Sigma, USA)
- ❖ LB Broth (Sigma, USA)
- ❖ Trypton (Duchefa, Nizozemsko)
- ❖ Tris (Duchefa, Nizozemsko)
- ❖ Tween 20 (NeoLab, Německo)

### 3.1.4 Média

- ❖ LB Agar (10 g tryptonu, 10 g NaCl, 5 g kvasničného extraktu a 16 g agaru na 1 liter) - sterilizováno autoklávováním
- ❖ LB médium (9,5 g chloridu sodného, 15,5 g LB Broth; doplněno do 1 l destilovanou vodou) - sterilizováno autoklávováním
- ❖ SOC médium (2% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) extrakt z kvasnic; 0,05% (w/v) NaCl; 0,01 mol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 0,01 mol·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>; 0,0025 mol·l<sup>-1</sup> KCl a 0,02 mol·l<sup>-1</sup> glukózy)
- ❖ YEB médium (bactopepton 0,5%; sacharosa 0,5%; hovězí extrakt 0,5%; kvasnicový extrakt 0,5%; modrá skalice 0,05%; agar 1,5%)
- ❖ AS médium (10 mM MES upraveno na pH = 5,6; 150 mmol·l<sup>-1</sup> acetosyringon; 10 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; doplněno vodou na objem 1 l)

#### 3.1.4.1 Antibiotika

- ❖ Gentamycin 50 mg/ml (Sigma, USA)
- ❖ Hygromycin (Sigma, USA)
- ❖ Kanamycin 50 mg/ml (Sigma, USA)
- ❖ Rifampicin 50 mg/ml (Sigma, USA)

### 3.1.5 Materiál pro agarosovou elektroforézu

- ❖ 1% (w/v) agarosový gel (1 g agarosy rozpuštěn ve 100 ml TAE pufru pomocí mikrovlnné trouby)
- ❖ TAE pufr (1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, 40 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 20 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina octová; pH = 8.0)
- ❖ 1 kb plus DNA ladder – standard molekulových hmotností (Thermo Scientific, USA)
- ❖ Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- ❖ 6x Loading Dye (Thermo Scientific, USA)

### 3.1.6 Roztoky pro SDS-PAGE a Western-blot s imunodetekcí

- ❖ 10x Transferový pufr (0,2 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 1,2 mol·l<sup>-1</sup> glycin; pH = 8,5)

- ❖ 1x Blotovací pufr (20 (v/v) transferový pufr, 5% (v/v) methanol)
- ❖ Barvicí roztok na membránu (0,5% (w/v) amidočern, 50% (v/v) methanol, 7% (v/v) kyselina octová)
- ❖ Barvicí roztok na gel (0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 50% methanol, 10% kyselina octová)
- ❖ Odbarvovací roztok (40% methanol, 10% kyselina octová)
- ❖ 1x TBS promývací pufr (4,84 g Tris; 58,44 g NaCl na 2 l, pH 7,5)
- ❖ 1x TBST promývací pufr (100 ml 10x TBS; 900 ml dH<sub>2</sub>O; 500 µl Tween 20)
- ❖ Blokovací pufr: (5% sušené mléko v TBS-T pufru)
- ❖ Pufr s primární nebo sekundární protilátkou (20% blokovací pufr, ředění primární protilátky anti-Myc v poměru 1:750, anti-His v poměru 1:500, anti-GFP v poměru 1:500 a ředění sekundární protilátky v poměru 1:5000)

### 3.1.6.1 Protilátky

- ❖ anti-Myc 1:750 (Millipore)
- ❖ anti-His 1:500 (eBioscience)
- ❖ anti-GFP 1:500 (ab290) (Abcam, Velká Británie)
- ❖ goat anti-rabbit 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- ❖ rabbit anti-mouse 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

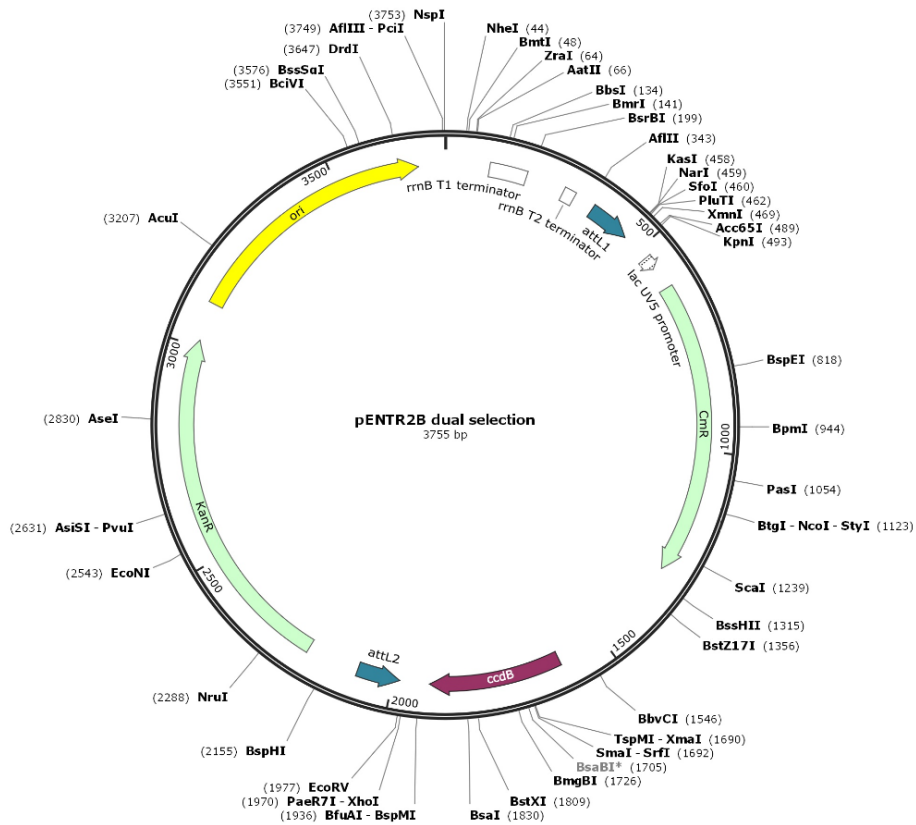
### 3.1.7 Vektory

- ❖ pENTR2B dual selection (Invitrogen, USA)

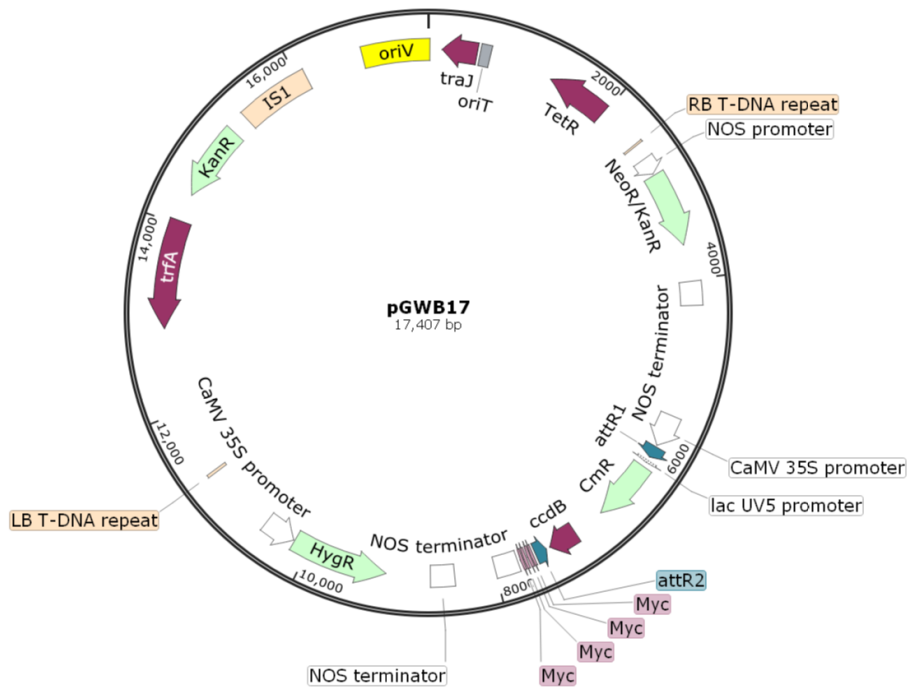
Komerční donorový vektor sloužící jako základ při rekombinační BP reakci metody Gateway. Mapa vektoru je znázorněna a popsána na Obr. 6.

- ❖ pGWB17 (Nakagawa *et al.*, 2007)

Cílový vektor slouží jako základ při rekombinační LR reakci metodou Gateway. Mapa vektoru je znázorněna a popsána na Obr. 7.



Obr. 6 Mapa vektoru pENTR2B



Obr. 7 Mapa vektoru pGWB17



### 3.1.8 Enzymy

#### 3.1.8.1 Restrikční endonukleasy

- ❖ AscI - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)
- ❖ BamHI - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)
- ❖ EcoRV-HF - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)
- ❖ FseI - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)
- ❖ NheI - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)
- ❖ NotI - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)
- ❖ SpeI - 20 000 U·ml<sup>-1</sup> (NEB, USA)

#### 3.1.8.2 Ostatní

- ❖ Alkalická fosfatasa Fast AP (1000 U·ml<sup>-1</sup>) (Thermo Scientific, USA)
- ❖ GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U·ml<sup>-1</sup>) (Promega, USA)
- ❖ Phusion HF (High-Fidelity) DNA polymerasa (2000 U·ml<sup>-1</sup>) (NEB, USA)
- ❖ T4 DNA ligáza (Thermo Scientific, USA)

### 3.1.9 Klonovací pufr

- ❖ 5x GoTaq Flexi pufr (Promega, USA)
- ❖ 10x CutSmart pufr (NEB, USA)
- ❖ 10x Ligační pufr (Thermo Scientific, USA)
- ❖ 5x Phusion HF pufr (NEB, USA)

### 3.1.10 Primery (Sigma-Aldrich, Německo)

Primer	Sekvence (5'-3')
pENTR fw	CTACAAACTCTTCCTGTTAGTTAG
eGFP rev01	GGTGGTGCAGATGAACTTCAGG
eGFP fw	CAACCACTACCTGAGCACC
PpIPT1_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGGTGAGTTTGCAGTTTGAGG
PpIPT1_rev_BamHI	TTACATAGAGGTCGTCAAGGATGATTCC
PpIPT3_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGTGGACTTCAAGAGCATGTACT TG
PpIPT3_rev_BamHI	TCAGAATCTAACTAAATTTTCGTGAGC
PpIPT4_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGATGTGGACTCAAAGAGCAGC ATG
PpIPT4_rev_BamHI	TCAGAATCTAACTACACTCCGTTGAAACTCC
PpIPT6_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGCGGACTTCAAGAGCATGTC
PpIPT6_rev_BamHI	TCAAACGTAAACAAATCTCCGTGG
pSL34_tNOS_rev	TGAACGATCGGGGAAATTCGAGCT

### 3.1.11 Biologický materiál

- ❖ Elektrokompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Invitrogen, USA)
- ❖ Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA) nesoucí expresní plazmidy pHSGM50::PpIPT1-4xMyc-6xHis, pHSGM50::PpIPT3-4xMyc-6xHis, pHSGM50::PpIPT4-4xMyc-6xHis a pHSGM50::PpIPT6-4xMyc-6xHis (připravené v rámci DP Jakuba Savary, 2017)
- ❖ Rostliny tabáku *Nicotiana bentamiana*

### 3.1.12 Software

- ❖ ImageLab (Bio-Rad, USA)
- ❖ SnapGene (<http://www.snapgene.com/>)
- ❖ BioEdit

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava mikroorganismů

#### 3.2.1.1 Kultivace

S mikroorganismy bylo nutné pracovat ve sterilních podmínkách, aby nedošlo k jejich kontaminaci, a proto byl využit laminární box, který byl před každým použitím sterilizován UV zářením. Bakterie *Escherichia coli* nesoucí konstrukty genu *PpIPT* byla kultivovaná v LB médiu přes noc, nejdéle však 16 hodin při 37 °C za stálého třepání při 130 rpm. Další bakterie *Agrobacterium tumefaciens* byla kultivována 3 dny při 28 °C. Ostatní kultivace prováděné na agarových plotnách byly realizovány v inkubátoru při 37 °C.

#### 3.2.1.2 Skladování

Mikroorganismy skladované pouze krátkou dobu byly ponechány v lednici jim určené při 4 °C po dobu maximálně jednoho měsíce, ale kultury obsahující plazmidy s vklonovanými konstrukty genů byly uskladněny ve formě 50% zásobního roztoku glycerolu v mrazáku při teplotě -80 °C.

### 3.2.2 Metody používané při práci s DNA

#### 3.2.2.1 Transformace buněk *Agrobacteria tumefaciens* GV3101

Využití bakterie *A. tumefaciens* pro genetickou modifikaci rostlin je jednou z nejvíce používaných transformačních metod molekulární biologie. Do bakteriální kultury *A. tumefaciens* GV3101 vyjmuté z mrazáku a umístěné na led byla napipetována ligační směs obsahující konstrukty genů *PpIPT* a nechána 10 minut na ledu, následně byla suspenze podrobena elektroporaci na přístroji BTX (ECM 399) nebo ponechána v tekutém dusíku po dobu 1 minuty. Dále bylo třeba suspenzi opět ochladit na ledu a bylo k ní přidáno 500 µl SOC média a celá směs ponechána 2 hodiny na třepačce vyhřáté na 28 °C. V závěru byla suspenze zcentrifugována při 4000 rpm po dobu 5 minut, část supernatantu byla odstraněna a ve zbylém objemu došlo k resuspendování peletu a inokulaci na Petriho misku s LB médiem a antibiotiky Kanamycinem, Rifampicinem a Gentamycinem. Takto připravené P. misky byly ponechány ke kultivaci 2-3 dny při 28 °C.

### **3.2.2.2 Transformace buněk *Escherichia coli* TOP10**

Chemokompetentní buňky bakterie *E. coli* TOP 10 byly transformovány metodou teplotního šoku „heat shock“. Z mrazáku byly vyjmuty rozalíkvótované bakteriální buňky v mikrozkuvkách. Bakteriální buňky byly ponechány na ledu rozmraznout a k nim bylo přidáno 7,5 µl ligační směsi a ponecháno 3 minuty na ledu. Mezitím bylo rozeřáno SOC médium na třepačce a rovněž bylo nutné vyhřát termoblok na 42 °C, což byla teplota, při níž byl proveden teplotní šok po dobu 1 minuty. Po provedení transformace byla mikrozkuvka s bakteriální suspenzí ponechána na ledu po dobu 3 minut a přidáno 300 µl SOC média. Nakonec byla směs umístěna na třepačku (800 rpm) rozeřátou na 37 °C po dobu 1 hodiny. Následně byla provedena centrifugace při 4000 rpm po dobu 5 minut. Stejně jako tomu bylo v případě transformace *A. tumefaciens* byla část supernatantu odstraněna a zbytek použit k resuspendování peletu. Inokulace proběhla za sterilních podmínek. Vyžíhanou hokejkou byla suspenze rozetřena na Petriho misku s LB médiem a Kanamycinem. Kultivace probíhala přes noc v inkubátoru při 37 °C.

### **3.2.2.2 Izolace plasmidů s použitím QIAprep Spin Miniprep Kit**

Bakteriální kultura nesoucí příslušný plasmid byla kultivována v LB médiu přes noc za stálého třepání při 37 °C. Po kultivaci bylo získáno 15 ml bakteriální kultury, která byla podrobena centrifugaci po dobu 10 minut při 5000 g. Supernatant byl odstraněn a usazený pelet byl resuspendován dle přiloženého manuálu výše zmíněné soupravy QIAprep Spin Miniprep Kitu. Plasmid byl z kolony eluován pufrém EB, jehož množství záviselo na tom, jakou výslednou koncentraci izolovaného plazmidu bylo potřeba získat, ale pohybovalo se v rozmezí 20-55 µl. Takto vyizolovaný plasmid byl použit k dalšímu zpracování a změřena koncentrace v jednotkách ng/µl na spektrofotometru NanoDrop One. Jako BLANK byl použit eluční pufr EB.

### **3.2.2.3 Purifikace PCR produktů pomocí soupravy NucleoSpin Gel and PCR clean-up**

PCR produkt byl doplněn Nuclease free vodou na objem 200 µl a dále bylo postupováno dle přiloženého manuálu soupravy NucleoSpin Gel and PCR clean-up. Eluce byla provedena za použití 25 µl NE pufru a změřena koncentrace v jednotkách ng/µl na spektrofotometru NanoDrop One. Jako BLANK byl použit eluční pufr NE.

### 3.2.2.4 Měření optické hustoty bakteriální kultury

Po kultivaci *Agrobacterium tumefaciens* příslušným vektorem s vklonovanými konstrukty byla měřena optická hustota suspenze bakteriální kolonie v AS médiu při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ) na spektrofotometru NAS 99 s použitím plastových kyvet.

### 3.2.2.5 Agarosová elektroforéza

Elektroforéza byla provedena v roztoku 1% agarosy v TAE pufru v horizontálním uspořádání. Elektroforetická vanička byla naplněna v případě přípravy malého gelu 50 ml (100 ml při přípravě velkého gelu) 1% roztoku agarosy a pro lepší detekci bylo přidáno 10  $\mu$ l (pro velký gel 20  $\mu$ l) ethidium bromidu. Do takto připravených elektroforetických vaniček byly umístěny hřebínky dle potřebného počtu jamek v závislosti na množství vzorků a takto nalitý gel se ponechal 20 minut za laboratorní teploty tuhnout. Po vyndání hřebíků proběhlo nanesení 7  $\mu$ l vzorků smíchaných s 5  $\mu$ l vzorkovacího pufru 5x Loading Dye a 2  $\mu$ l standardu molekulových hmotností (1 kb Plus DNA Ladder) a samotná elektroforéza v elektroforetické komůrce při napětí 110 V po dobu 30 minut v prostředí 1x koncentrovaného TAE pufru.

### 3.2.2.6 SDS-PAGE elektroforéza

K provedení elektroforézy SDS-PAGE byl použit 4% zaostřovací a 10% separační 1 mm gel o velikosti 10x10 cm. Vzorek proteinu byl smíchan s vzorkovým pufrem obsahujícím kromě SDS i redukční činidlo  $\beta$ -merkaptoethanol. Jako první byl připraven separační gel s přidavkem TEMEDu a persíranu amonného. Takto připravený roztok gelu byl nalit mezi dělicí skla a převrstven butanolem a ponechán 30 minut stát. Po ztuhnutí gelu byl butanol slit z povrchu gelu a ten byl propláchnut destilovanou vodou. Zbytky vody byly z povrchu gelu odstraněny kouskem filtračního papíru. Následně byl připraven zaostřovací gel smícháním TEMEDu a persíranu amonného a ten byl nalit na povrch ztuhlého separačního gelu. Do takto připraveného zaostřovacího gelu byl ponořen hřebínek a celý gel byl ponechán opět 30 minut, aby gel ztuhl, mohl být odstraněn hřebínek a vzniklé jamky mohly být propláchnuty destilovanou vodou. Celá soustava dělicích skel a gelu byla přemístěna do elektroforetické vany a doplněna elektrodovým pufrem 1x zředěným. Stejným pufrem byly rovněž propláchnuty i jamky a do nich byly nanесeny vzorky a standard (PageRuler protein unstained ladder). Po provedení těchto úkonů byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji

proudu. Zpočátku pro účel zakoncentrování vzorku byl vzorek nechán po dobu 20 minut migrovat zaostřovacím gelem při napětí 100 V, a poté bylo napětí zvýšeno na 140 V a separace běžela do doby, kdy vzorky doputovaly na konec dělicího skla. Po provedení elektroforézy byl odpojen proud, gel vyjmut a inkubován za laboratorní teploty v Coomassie Brilliant Blue barvicím roztoku na třepačce (50 rpm). Poté byl odbarven pomocí odbarvovacího roztoku na třepačce.

### **3.2.2.7 Analýza Western-blot**

Po separaci vzorků metodou SDS-PAGE byl gel přenesen na PVDF membránu pomocí elektroblotování. Membrána byla následně obarvena amidočerní, aby došlo k vizualizaci proteinů. Membrána byla nastříhána tak, aby bylo možno jednotlivé dráhy ošetřit příslušnou primární protilátkou. Poté byla membrána blokována v 5% odtučněném mléku (v TBST) po dobu jedné hodiny, promyta 3x v TBST a TBS pufru. Poté byla na membránu přidána primární protilátka v 1% odtučněném mléku v TBST a inkubována po dobu jedné hodiny. Ke specifické detekci proteinů byly použity primární protilátky rabbit anti-Myc (1:750), rabbit anti-His (1:500) a rabbit anti-GFP (1:500). Membrány byly opět třikrát promyty v TBST a TBS pufru, a poté aplikovány sekundární protilátky goat anti-rabbit (1:5000) a rabbit anti-mouse v 1% odtučněném mléku v TBST (1:5000) a inkubovány po dobu 45 minut. Membrány byly opět třikrát promyty v TBST a TBS pufru a poté aplikován detekční roztok SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo) a signál byl zaznamenán pomocí dokumentační stanice ChemiDoc XRS+ systém.

### **3.2.2.8 Amplifikace genu metodou PCR**

Polymerázová řetězová reakce sloužila k amplifikaci genu *GFP*, *IPT1*, 3, 4 a 6 díky DNA polymeráze. Jako templát bylo použito 10 ng plasmidů pKLG50 nesoucího jednotlivé *PpIPT* geny. Aby bylo možné amplifikace dosáhnout, musela reakční směs obsahovat HF pufr, Phusion High-Fidelity DNA Polymerasu, templát a amgenově specifické primery. Přesné složení směsi včetně objemů udává Tab. 1. Reakce probíhala v objemu 20 µl v termocycleru za podmínek uvedených v Tab. 2. Příprava reakční směsi byla prováděna na ledu a enzym byl do reakční směsi přidán až jako poslední, aby nedošlo k jeho degradaci.

Tab. 1 Směs pro amplifikaci genů *IPT1*, 3, 4, 6 metodou PCR.

Složka směsi	Objem složek (μl) na jednu 20 μl
5x Buffer HF	4
10 x dNTP	2
Forward primer ( <i>Asc</i> I; 10 μmol/l)	1
Reverse primer ( <i>Bam</i> H1; 10 μmol/l)	1
Templát - DNA	1
Phusion polymerasa	0,2
Nuclease free voda	10,8

Tab. 2 Podmínky PCR reakce pro termocycler.

Fáze cyklu	Teplota (°C)	Čas (min.)	Opakování
1 Počáteční denaturace	98	2:00	1x
2 Denaturace	98	0:20	
3 Annealing	variabilně	0:20	34x
4 Elongace	72	variabilně	
5 Konečná elongace	72	10:00	1x

### 3.2.2.9 Restrikce PCR produktů

Před samotnou restrikcí byly PCR produkty pomocí komerční soupravy NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey Nagel) purifikovány. Plasmid pENTR2B-GFP byl štěpen restrikčními endonukleázami *Bam*HI a *Xmn*I v CutSmart pufru, jak je uvedeno v Tab. 4. Naproti tomu PCR produkty byly štěpeny pouze enzymem *Bam*HI (Tab. 3).

Reakce byla nastavena v objemu 50 μl a ponechána přes noc v inkubátoru při 37 °C. Další den byla k reakční směsi obsahující plasmid pENTR2B-GFP přidána alkalická fosfatáza – FastAP (Thermo Scientific) a ověřena úspěšnost restrikce agarosovou elektroforézou.

Tab. 3 Směs pro restrikci PCR produktů (genů *IPT1*, 3, 4, 6).

Složka směsi	Objem složek (μl) na jednu 50 μl
10x CutSmart	5
<i>Bam</i> H1	1
PCR produkt ( <i>IPT1</i> , 3, 4, 6)	44
Nuclease free voda	-

Tab. 4 Směs pro restrikci plasmidu pENTR2B-GFP #8.

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 50 μl</b>
10x CutSmart	5
Xmn1	1
BamH1	1
pENTR2B-GFP #8	30
Nuclease free voda	13,5

### 3.2.2.10 Ligace

Ligační reakce byla provedena s přidavkem T4 DNA ligázy v prostředí ligačního pufru za laboratorní teploty po dobu dvou hodin. Celkový objem reakce činil 10 μl a všechny komponenty reakce jsou uvedeny v Tab. 5 a 6. Cílem ligační reakce bylo spojení plasmidu pENTR2B-GFP s geny *PpIPT1*, 3, 4 a 6. Byly nastaveny dvě ligační reakce, jedna s plasmidem a inzertem a druhá s destilovanou vodou a annealed oligem místo inzertu.

Tab. 5 Směs určená k ligaci vektoru pENTR2B-GFP s geny *PpIPT1*, 3, 4 a 6.

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 10 μl reakci</b>
10x Ligační pufr	1
Vektor pENTR2B-GFP	1,5
PCR produkt (IPT1, 3, 4, 6)	6,5
T4 DNA ligasa	1
Nuclease free voda	-

Tab. 6 Směs pro kontrolní ligaci s použitím annealed oligo.

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 10 μl reakci</b>
10x Ligační pufr	0,85
Vektor pENTR2B-GFP	1,5
Annealed oligo	3,15
T4 DNA ligasa	1
Nuclease free voda	3,5



### 3.2.2.11 Colony PCR screening

Tato metoda slouží k ověření transformace klonovaného plasmidu v bakterii *E. coli*. Přes noc v inkubátoru při 37 °C narostly bílé kolonie, které byly vypíchnuty pomocí plastové špičky a po krátkém ponoření do reakční směsi inokulovány na předem označené Petriho misky s Kanamycinovým antibiotikem. Takovými miskám se říká „replika misky“, které se nechají inkubovat přes noc v inkubátoru při 37 °C, aby mohly být následně po provedení kontrolní agarosové elektroforézy označeny pozitivní kolonie a ty pak mohly být kultivovány v tekutém LB médiu kvůli zmnožení, abychom mohli provést izolaci plasmidů a sekvenaci. Je dobré si další den z narostlé bakteriální suspenze vytvořit zásobní glycerolové roztoky nazývané „glycerol stock“.

Abychom ověřili přítomnost DNA inzertů (genů *PpIPT*) v pENTR2B-GFP plasmidu byly kolonie použity jako templát pro PCR reakci v přítomnosti GoTaq G2 Flexi DNA polymerázy (Thermo Scientific) a primerů (Tab. 7). S výslednými PCR produkty byla provedena analýza v agarosovém gelu.

Tab. 7 Složení reakční směsi pro PCR reakci (ověření přítomnosti genů *PpIPT1*, 3, 4 a 6).

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 15 μl reakci</b>
5x Green pufr	3
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP	1,5
Forward primer (pENTR)	0,75
Reverse primer (eGFP 01)	0,75
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,05
Nuclease free voda	7,45

### 3.2.2.12 Kontrolní restrikce

Pro ověření vklonování inzertu (sekvencí jednotlivých genů *PpIPT*) do vektoru pENTR2B-GFP byly provedeny kontrolní restrikce za použití odlišných restrikčních enzymů (Tab. 8, 9 a 10). Jednotlivé fragmenty byly ověřeny analýzou v agarosovém gelu dle popisu metody 3.2.2.5.

Tab. 8 Složení reakční směsi pro kontrolní restrikci insertů *PpIPT1*, 4 a 6 v plasmidu

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 20 μl reakci</b>
10x CutSmart	2
AscI	0,5
BamHI	0,5
pENTR2B- <i>PpIPT1/4/6</i> -GFP	3
Nuclease free voda	14

pENTR2B-GFP.

Tab. 9 Složení reakční směsi pro kontrolní restrikci insertu PpIPT4 v plasmidu pENTR2B-GFP.

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 20 μl reakci</b>
10x CutSmart	2
Not1-FD	0,5
pENTR2B::PpIPT4 -GFP	3
Nuclease free voda	14,5

Tab. 10 Složení reakční směsi pro kontrolní restrikci insertu PpIPT3 a 6 v plasmidu pENTR2B-GFP.

<b>Složka směsi</b>	<b>Objem složek (μl) na jednu 20 μl reakci</b>
10x CutSmart	2
Nhe1	0,5
BamH1-HF	0,5
pENTR2B::PpIPT3/6 -GFP	2
Nuclease free voda	15

### 3.2.2.13 LR reakce

Mezi vstupním vektorem pENTR2B-GFP s místy attL a cílovým vektorem pGWB17 s místy attR byla provedena homologní rekombinace pomocí LR reakce za tvorby expresního vektoru. K provedení LR reakce byl potřeba vstupní vektor (pENTR2B-GFP) o koncentraci 135 ng/μl, cílový vektor (pGWB17) o koncentraci 135 ng/μl, 10 mM TE pufr o pH 8,0 doplněný na finální objem 10 μl. Před přidáním 1,25 μl enzymu LR clonázy Mix II byla směs ponechána v termostatu vyhřátém na 45 °C po dobu 5 minut. Po přidání enzymu byla směs ponechána několik hodin při laboratorní teplotě (25 °C), aby mohla proběhnout LR reakce, která byla zastavena přidáním 1 μl proteinázy K (EC 3.4.21.14) proběhla inkubace při teplotě 37 °C po dobu 20 minut. Na závěr proběhla transformace 5 μl výsledné směsi do *E. coli* TOP10 a inokulace na P. misku s LB médiem obohacených o přídavek antibiotik Kanamycinu a Hygromycinu.

### 3.2.2.14 Sekvenace

Připravené vzorky (od každého 7,5 μl) obsahující 6 μl izolované plasmidové DNA zředěné na příslušnou koncentraci (~ 100 ng·μl<sup>-1</sup>) a 1,5 μl primeru (pENTR-seq-forward

a eGFP-seq-reverse01) byly odeslány na sekvenaci do firmy SEQem, Dobříš, Česká republika. Následně byly výsledky vyhodnoceny v programu BioEdit verze 7.2.5.

### 3.2.3 Příprava bakteriálních konzerv

Jak již bylo zmíněno u metody Colony PCR screening, tak byly využity pouze pozitivní kolonie z „replika misky“, které byly naočkovány do 50 ml falkon naplněných 15 ml LB média spolu s přidaným Kanamycinovým antibiotikem a ponechány ke kultivaci přes noc při 37 °C na třepačce o 180 rpm. Další den bylo odpipetováno 500 µl suspenze do 2 ml mikrozkušavky a přidáno 500 µl 50% glycerolu. Mikrozkušavky byly následně umístěny na pár minut do tekutého dusíku pro konzervaci, a poté umístěny do mrazáku na -80 °C.

### 3.2.4 Infiltrace listů *Nicotiana benthamiana*

Jedná se o metodu využívající bakteriální kulturu *Agrobacterium tumefaciens* k infekci listů rostlin tabáku *Nicotiana benthamiana*. Použilo se 6 mikrozkušavek s rozalíkvótovaným množstvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vyjmutých z mrazáku, které se nechaly stát na ledu stejně tak jako vyjmuté zásobní roztoky obsahující plasmidy s vklonovanými geny *PpIPT*, dále bylo použito 35S::GFP a p19. Do každé z mikrozkušavek s bakterií bylo přidáno vždy 20 µl zásobního roztoku a SOC média. Celá směs byla ponechána 10 minut na ledu, a poté byly mikrozkušavky ponořeny na 1 minutu do tekutého dusíku pro dosažení teplotního šoku, následně byly mikrozkušavky umístěny na třepačku na dobu 2 hodin. Dále proběhla inokulace do malého a následně většího objemu LB média do Erlenmeyerových baněk s použitím antibiotika Kanamycinu a necháno kultivovat přes noc na třepačce o 180 rpm při 37 °C. Další den byla bakteriální suspenze zcentrifugována při 15000 g po dobu 10 minut, supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v infiltračním AS médiu a poté opět zcentrifugován za stejných podmínek, supernatant odstraněn a pelet znovu rozsuspendován přídatkem 40 µl AS média. Mezitím byly 3 týdny staré rostliny tabáku zality do podmisky a umístěny do plastového pytle (Obr. 8), aby došlo k otevření průduchů a infiltrace tak byla snadnější. U všech bakteriálních suspenzí byla na spektrofotometru proměřena optická hustota při vlnové délce 600 nm. Protože byly bakteriální suspenze husté, bylo potřeba je vyředit až na OD<sub>600</sub> rovno 0,3. Nakonec bylo odebráno 5 ml suspenze s *PpIPT*1, 3, 4, 6 a GFP a ke každé z nich přidáno 5 ml

suspenze s p19. Takto připravené suspenze mohly být s pomocí 1 ml injekční stříkačky infiltrovány skrz spodní stranu listu do expresního systému rostliny (Obr. 9), což bylo možné po třech dnech inkubace pozorovat pod konfokálním mikroskopem.



Obr. 8 Snímek zachycující umístění rostlin *N. benthamiana* do igelitu několik hodin před infiltrací.

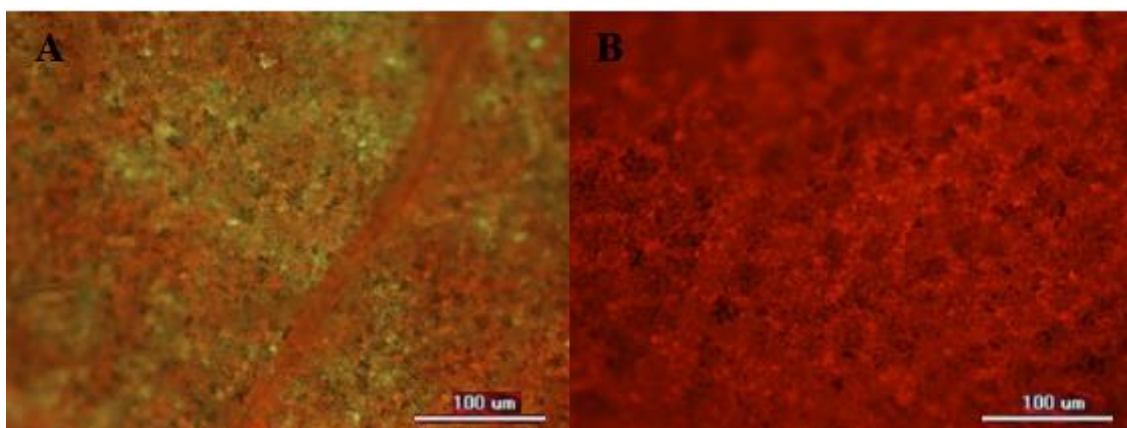


Obr. 9 Snímek zachycující 3 týdny staré rostliny *N. benthamiana*.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Transientní exprese PpIPT v listech *Nicotiana benthamiana*

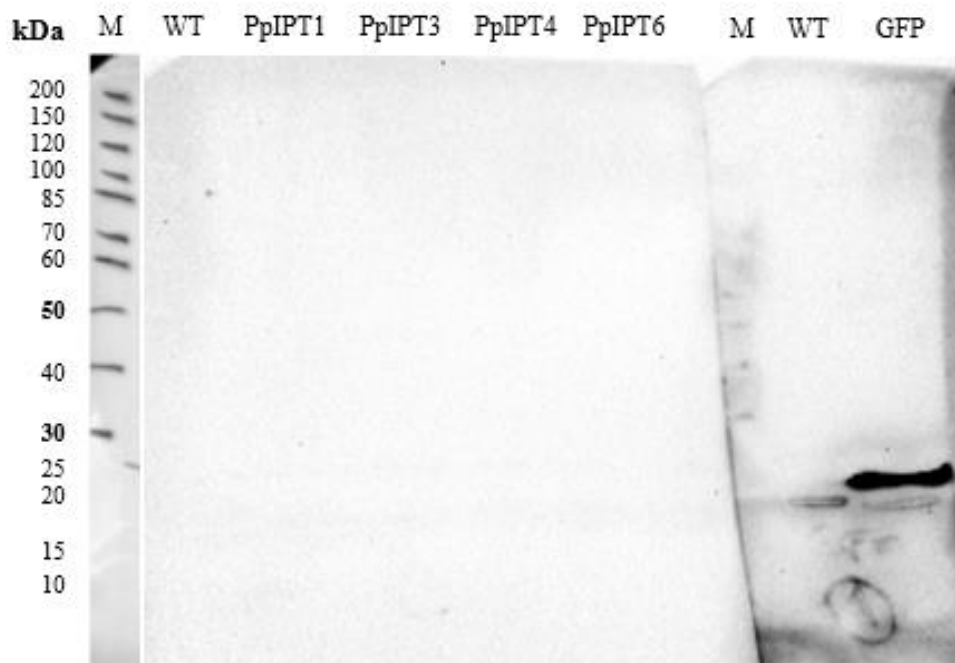
Experiment byl zahájen výsevem rostliny *Nicotiana benthamiana*, protože byla pro účely experimentu potřeba 3-4 týdenní rostlina. V dalším kroku byly využity již připravené expresní konstrukty nesoucí geny *PpIPT1* (klon č. 2), *PpIPT3* (klon č. 14), *PpIPT4* (klon č. 26) a *PpIPT6* (klon č. 42) označené na C-konci pomocí 6xHis kotvy C-myc značky. Konstrukty byly připraveny v rámci diplomové práce Mgr. Jakuba Savary. Dále byl využit kontrolní konstrukt nesoucí expresní kazetu *35S::GFP*. Tyto konstrukty byly nejprve izolovány z kultury *E. coli* a následně transformovány do *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3101). Takto připravené kultury byly infiltrovány do spodní strany listů předem označených rostlin *N. benthamiana* pomocí 1 ml injekční stříkačky. Pokusné rostliny byly po infiltraci ponechány po dobu 3 dnů ve fytotronu za standardních podmínek, poté byl pomocí fluorescenční lupy a epifluorescenčního mikroskopu pozorován fluorescenční signál u kontrolních rostlin transformovaných konstruktem *35S::GFP*. U těchto rostlin byl opravdu pozorován rozdíl mezi infiltrovanou částí listu, která se jevila jako zelená a neinfiltrovanou částí, která byla červená (autofluorescence chlorofylu), jak dokazují pořízené snímky A a B na Obr. 10.



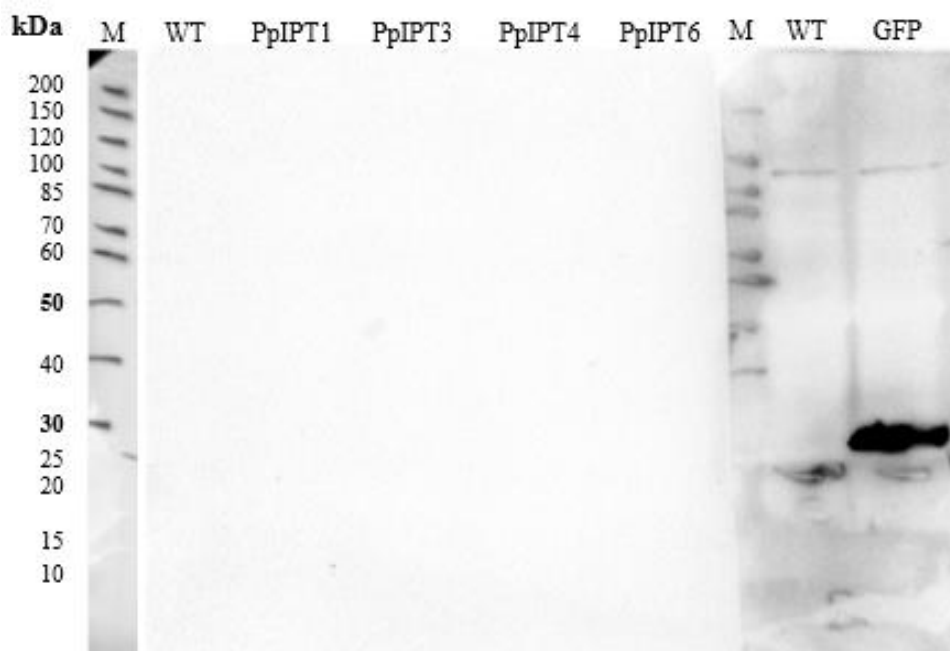
Obr. 10 Snímek zachycující spodní stranu listu tabáku *Nicotiana benthamiana* po infiltraci. Sekce A představuje oblast po infiltraci značenou zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) a sekce B zachycuje neinfiltrovanou oblast listu bez GFP signálu, která se jeví jako červeně zbarvená.

## 4.2. Analýza proteinů metodou Western-blot

Infiltrované listy *N. bentamina* byly sklizeny a zamrazeny v tekutém dusíku pro následnou analýzu proteinů pomocí metody western-blot. Nejprve byly připraveny proteinové extrakty, rozděleny v 10% akrylamidovém gelu a přeneseny na PVDF membránu. Byly připraveny dvě stejné membrány nesoucí vždy kontrolu (35S::GFP) spolu s jednotlivými PpIPT. Membrána byla po obarvení amidočerní rozstříhána a jednotlivé dráhy označeny specifickými primárními protilátkami. Část membrány s pozitivní kontrolou 35S::GFP byla značena anti-GFP protilátkou, zatímco zbytek membrány nesoucí jednotlivé PpIPT byl označen anti-Myc, respektive anti-His protilátkou. Bohužel detekce exprese rekombinantních PpIPT proteinů metodou western-blot nebyla úspěšná ani s anti-Myc (Obr. 11) ani s anti-His (Obr. 12) protilátkou, zatímco pozitivní kontrola detekována byla pomocí anti-GFP protilátky (Obr. 11 a 12). Pravděpodobně nedošlo k expresi PpIPT, nebo k ní došlo, ale jelikož jsou IPT proteiny velmi nestabilní, tak byly degradovány, a proto nebyly detekovány. Vzhledem k výše popsaným problémům byla pozměněna strategie s cílem provést expresi PpIPT proteinů označených pomocí GFP v tabákových listech. Je možné se domnívat, že GFP by mohlo napomoci stabilitě PpIPT proteinů. Pomocí GFP lze provést snadno a rychle detekci pomocí fluorescenčního mikroskopu a taktéž jej případně použít jako afinitní kotvu pro purifikaci proteinu. Za tímto účelem byla provedena příprava plasmidových konstruktů nesoucích expresní kazetu *35S::PpIPT-6xHis-GFP*. Kromě GFP nesou tyto konstrukty taktéž 6x histidinovou kotvu (His-tag), která umožňuje metal-chelatační chromatografickou purifikaci proteinu.



Obr. 11 SDS-PAGE elektroforeogram zachycující v levé části negativní signál po aplikaci anti-Myc protilátky u konstruktů PpIPT1, PpIPT3, PpIPT4 a PpIPT6 a v pravé části pozitivní signál po aplikaci protilátky anti-GFP, která slouží jako kontrola. WT zachycuje signál u neinfiltrované rostliny, který byl negativní.



Obr. 12 SDS-PAGE elektroforeogram zachycující v levé části negativní signál po aplikaci anti-His protilátky u konstruktů PpIPT1, PpIPT3, PpIPT4 a PpIPT6 a v pravé části pozitivní signál po aplikaci protilátky anti-GFP, která slouží jako kontrola. WT zachycuje signál u neinfiltrované rostliny, který byl negativní.

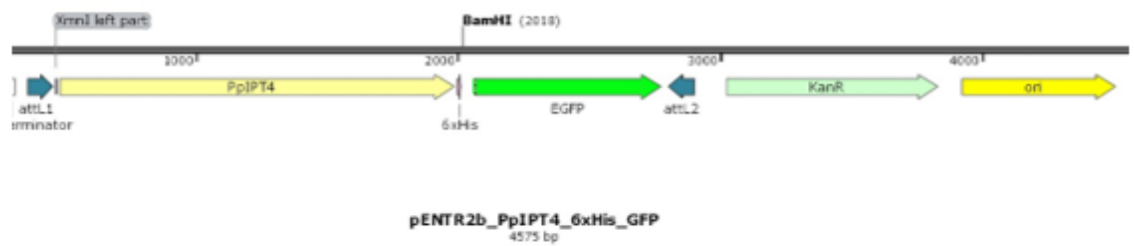
### 4.3. Klonování konstruktů 35S:PpIPT-GFP

Pro amplifikaci fragmentů nesoucích geny *PpIPT* byla v úvodu provedena optimalizace podmínek PCR reakce. Za účelem optimalizace byla využita kombinace primerů nesoucích restrikční místa *AscI* respektive *BamHI* (Tab. 1). Jako templát byly použity původní plasmidové konstrukty *35S:PpIPT-4xMyc* (Obr. 13, 14 a 15). PCR reakce byla analyzována za pomoci 1% agarosové elektroforézy (Obr. 16), která byla úspěšná, jednotlivé PCR produkty byly využity k dalšímu klonování. Následně byla provedena purifikace PCR produktů, které byly naštěpeny restrikčními enzymy *BamHI* poskytující lepidelný konec na 3'-konci, zatímco 5'-konec zůstal tupý. Naproti tomu klonovací vektor *pENTR2B-GFP* byl naštěpen enzymy *BamHI* a *XmnI* vytvářející tupý konec, kompatibilní s 5'-koncem PCR produktu. Po restrikci byly naštěpené PCR produkty i *pENTR2B-GFP* opět ověřeny elektroforézou v 1% agarosovém gelu (Obr. 17). Poté byla provedena ligace jednotlivých PCR produktů obsahujícími *PpIPT1*, 3, 4, 6 do připraveného vektoru *pENTR2B-GFP*. Následně byla ligační směs transformována do bakterie *E. coli* TOP10 a selektována na LB mediu s Kanamycinem. Transformované kolonie byly testovány pomocí tzv. colony PCR na přítomnost konstruktů *pENTR2B-PpIPT-GFP* pomocí vhodně zvolené kombinace specifických primerů. Po opakovaném provedení colony PCR screeningu byly získány pozitivní kolonie pouze u konstruktů *PpIPT3* (klon č. 10, 21, 39 a 59), *PpIPT4* (klon č. 18) a *PpIPT6* (klon č. 27 a 35). Konstrukt *PpIPT1* se nepodařilo klonovat pravděpodobně kvůli nízké efektivitě ligace tupých konců DNA fragmentů. Pozitivní klony po provedení kolony PCR screeningu jsou zachyceny na Obr. 18, 19 a 20. Následně byly pozitivní klony pomnoženy, byl z nich izolován plasmid a podroben kontrolní restrikci pomocí enzymů *AscI* a *BamHI* pro konstrukty *pENTR2B-PpIPT1-6xHis-GFP*, *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* a *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP*, konstrukt *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* byl ještě ověřen restrikcí za použití enzymu *NotI-FD* (Obr. 21). Další sada pozitivních kolonií pro konstrukty *pENTR2B-PpIPT3-6xHis-GFP* a *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP* byla opět pomnožena a byl izolován plasmid, který byl následně opět podroben kontrolní restrikci pomocí enzymů *NheI* a *BamHI-HF* (Obr. 22). Pozitivní klony byly na závěr ověřeny pomocí sekvenace. Správné klony jsou č. 21 a 59 u *PpIPT3*, u *PpIPT4* to byl klon č. 18 a u *PpIPT6* klon č. 35.

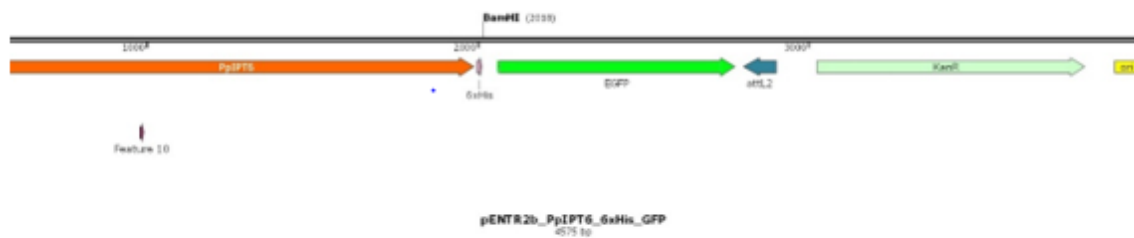




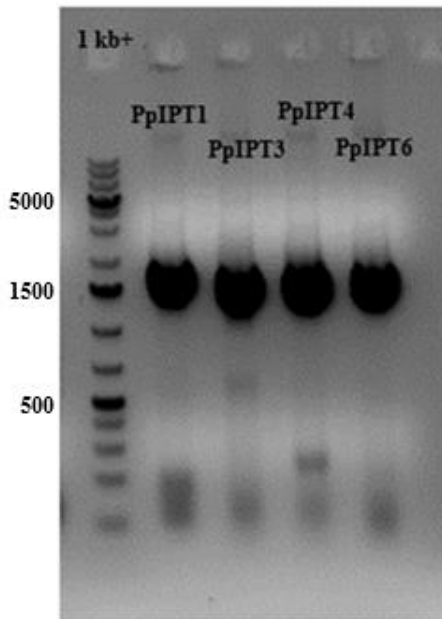
Obr. 13 Klonovací kazeta konstrukt *pENTR2B-PpIPT3-6xHis-GFP*.



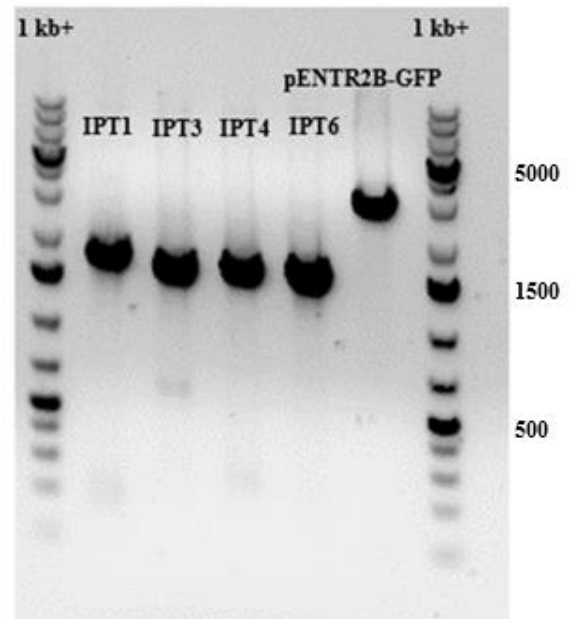
Obr. 14 Klonovací kazeta konstrukt *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP*.



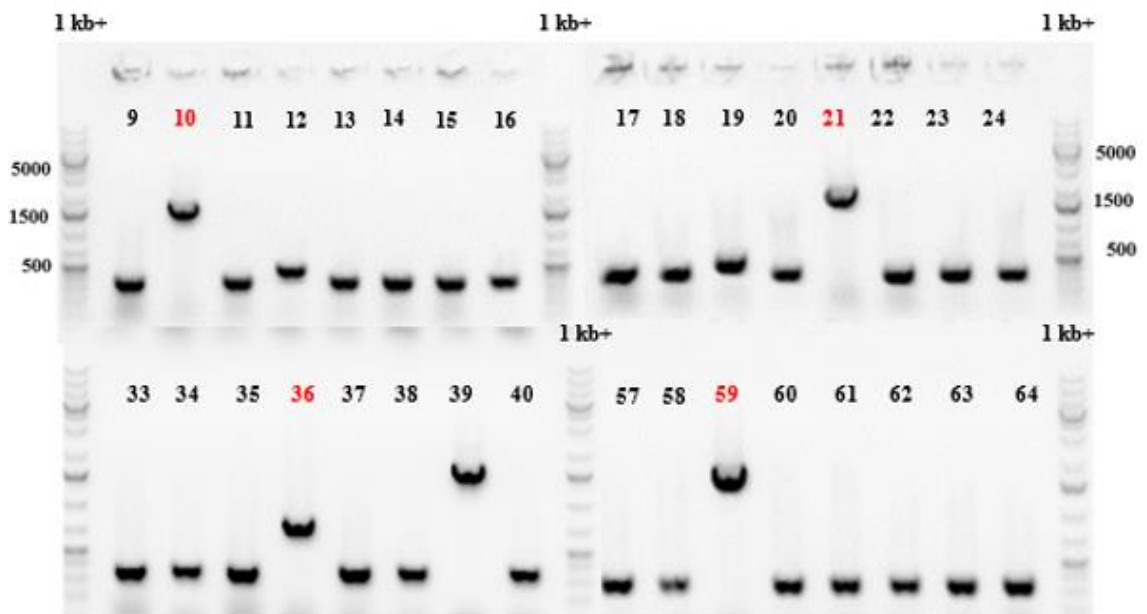
Obr. 15 Klonovací kazeta konstrukt *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP*.



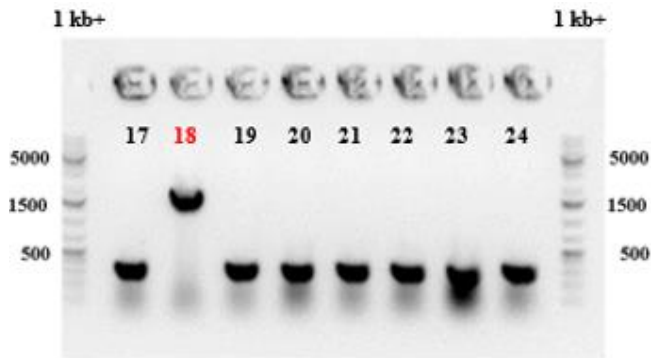
Obr. 16 PCR amplifikace genů *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4* a *PpIPT6*.



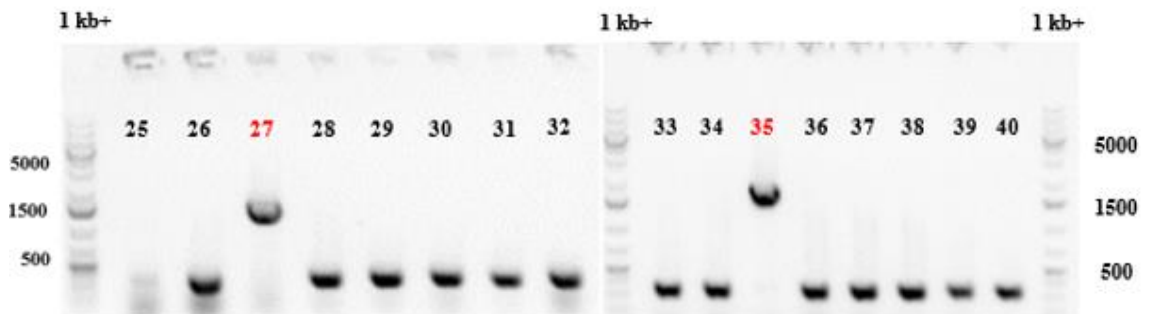
Obr. 17 Restrikce PCR produktů a plasmidu pENTR2B-GFP. PCR produkty byly ošetřeny pomocí BamHI, zatímco konstrukt pENTR2B-GFP byl ošetřen enzymy BamHI a XmnI.



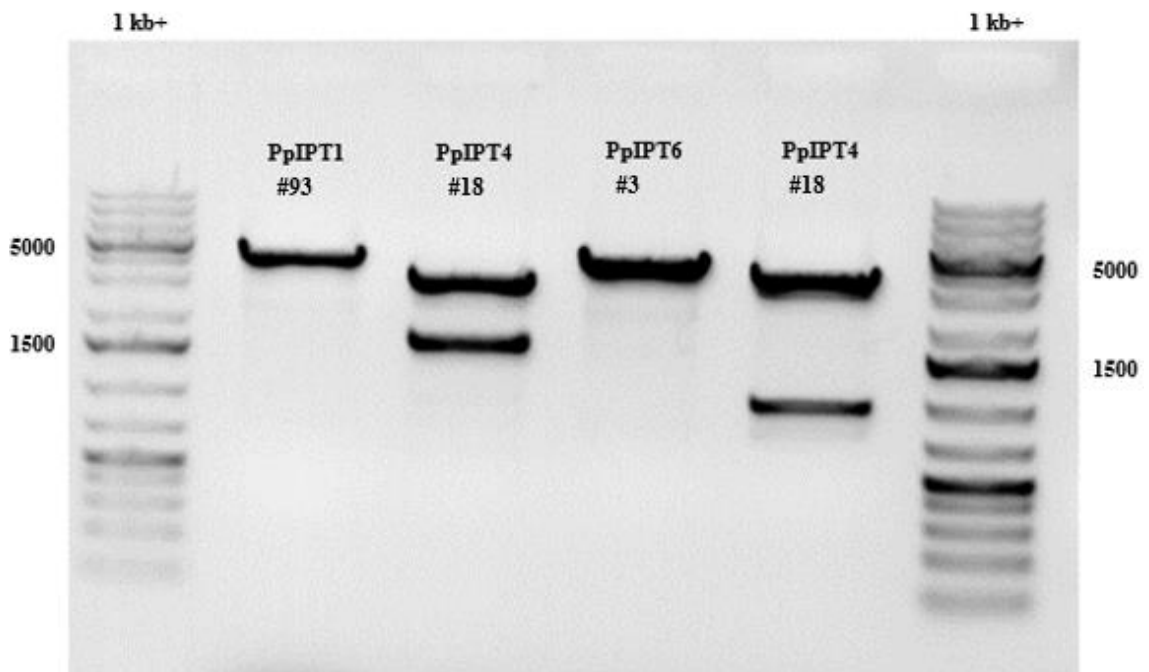
Obr. 18 Colony PCR pro *pENTR2B-PpIPT3-6xHis-GFP* konstrukt s pozitivními klony č. 10, 21, 39 a 59.



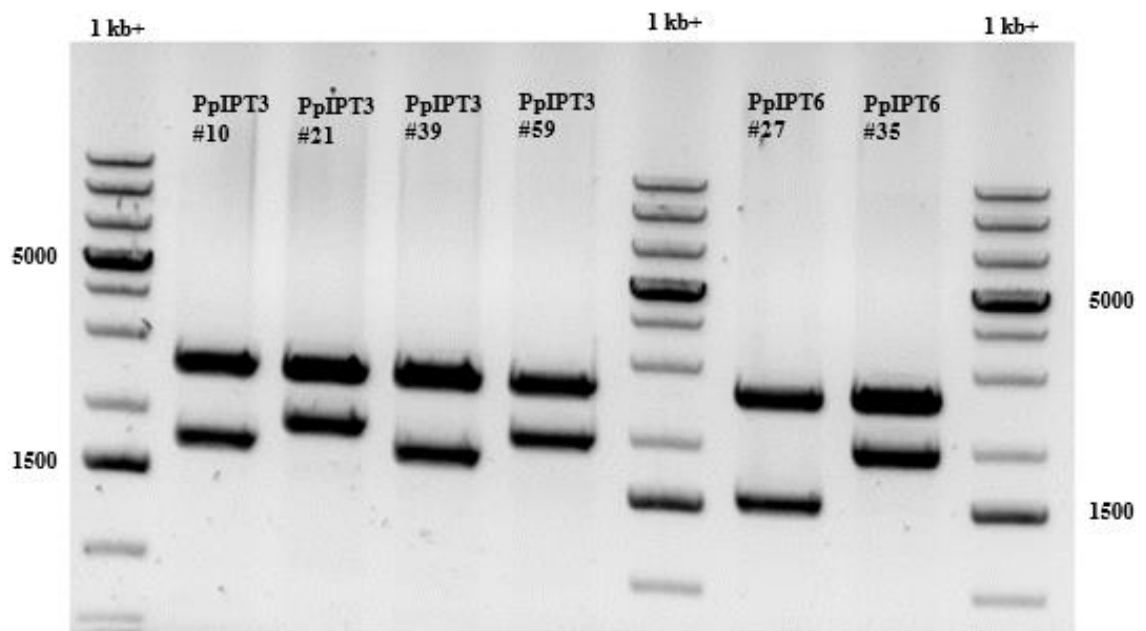
Obr. 19 Colony PCR pro *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* konstrukt s pozitivním klonem č. 18.



Obr. 20 Colony PCR pro *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP* konstrukt s pozitivními klony č. 27 a 35.



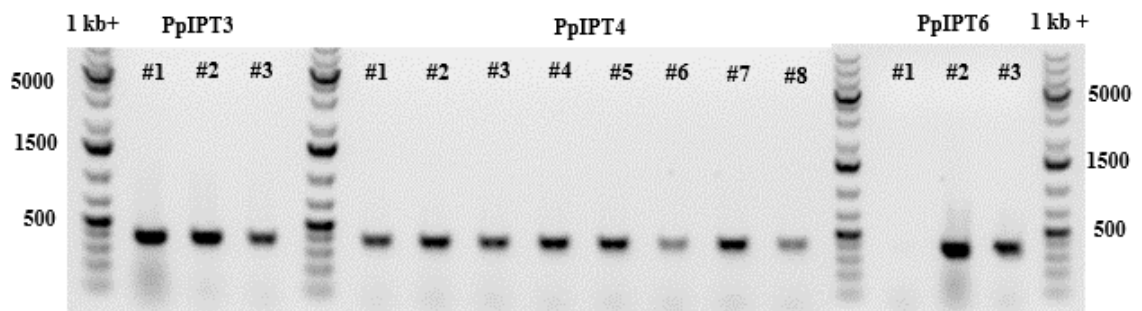
Obr. 21 Kontrolní restrikce pomocí enzymů *AscI* a *BamHI* pro konstrukty *pENTR2B-PpIPT1-6xHis-GFP*, *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* a *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP*. U konstruktu *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* byla restrikce provedena za použití enzymu *NotI-FD*.



Obr. 22 Kontrolní restrikce pomocí enzymů NheI a BamHI-HF pro konstrukty *pENTR2B-PpIPT3-6xHis-GFP* a *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP*.

Ověřené konstrukty *pENTR2B-PpIPT3-6xHis-GFP*, *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* a *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP* byly použity k LR rekombinaci do cílového (destinačního) binárního vektoru pGWB17. Před LR reakcí byla provedena linearizace destinačního vektoru pGWB17 pomocí XhoI, což značně zvyšuje účinnost LR reakce a minimalizuje vznik falešně pozitivních klonů. Cílem této reakce bylo získání binárních konstruktů *pGWB17-PpIPT-6xHis-GFP*, které mohou být využity ke genetické transformaci rostlinného materiálu. LR reakce proběhla úspěšně, jak potvrdil i kolony PCR screening (Obr. 23). Vybrané klony byly opět osekvenovány a byla ověřena správnost připraveného konstruktů. Následně mohla být provedena transformace získaných konstruktů do bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Z časových důvodů nebylo možné realizovat infiltraci tabákových listů. Tento experiment plánujeme dokončit v nejbližší době.



Obr. 23 Colony PCR pro *pGWB17-PpIPT3-6xHis-GFP*, *pGWB17-PpIPT4-6xHis-GFP* a *pGWB17-PpIPT6-6xHis-GFP* konstrukt. U všech proběhla LR reakce úspěšně.

## 5 ZÁVĚR

V rámci předkládané bakalářské práce byla v teoretické části zpracována literární rešerše na téma: Biosyntéza cytokininů v nižších rostlinách se zaměřením na *Physcomitrella patens*. Dále byla popsána modelová rostlina *Nicotiana benthamiana*, která byla v experimentální části využita jako rostlinný expresní systém pro PpIPT enzymy.

Experiment se skládal ze dvou fází. Nejprve byla provedena exprese PpIPT1, 3, 4 a 6 v tabákových listech s využitím konstruktů, které byly připraveny v rámci diplomové práce Mgr. Jakuba Savary. Jako první byla provedena infiltrace tabákových listů a následně analýza proteinů metodou western-blot, která nebyla úspěšná. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno v druhé fázi experimentu k přípravě nových konstruktů s využitím pokročilých klonovacích technik, kdy byl gen *PpIPT* klonován do vstupního (“entry“) vektoru *pENTR2B-GFP* s použitím restrikčních enzymů s lepivým (BamHI) a tupým (XmnI) koncem. Podařilo se úspěšně zaklonovat geny *PpIPT3*, *4* a *6*, které byly na 3'-konci označeny pomocí 6xHis kotvy. Výsledkem tohoto experimentu byly konstrukty *pENTR2B-PpIPT3-6xHis-GFP*, *pENTR2B-PpIPT4-6xHis-GFP* a *pENTR2B-PpIPT6-6xHis-GFP*. Bohužel gen *PpIPT1* se nepodařilo zaklonovat, pravděpodobně kvůli nízké účinnosti ligace tupého 5'-konce PCR produktu s tupým koncem vzniklým po restrikci *pENTR2B-GFP* enzymem XmnI. Správnost konstruktů byla ověřena kontrolní restrikcí a následná sekvenace pak potvrdila zachování čtecího rámce mezi genem *PpIPT*, *6xHis* a *GFP*. Tyto fúzní geny pak byly úspěšně překlonovány z *pENTR2B* klonů do destinačního vektoru *pGWB17* s využitím LR reakce. Tyto konstrukty byly opět ověřeny sekvenací a poté transformovány do *Agrobacterium tumefaciens*. Z časových důvodů již nebylo možné provést infiltraci tabákových listů s využitím těchto nově připravených konstruktů. Tento experiment bude proveden v budoucnu.

## 6 SEZNAM LITERATURY

- Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R. M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **81**, 5994-5998.
- Ashton N.W., Champagne C.E.M., Weiler T., Verkoczy L.K. (2000): The bryophyte *Physcomitrella patens* replicates extrachromosomal transgenic elements. *New Phytologist* **146**, 391-402.
- Barciszewski J., Siboska G.E., Pedersen B.O., Clark B.F.C., Rattan S.I.S. (1996): Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters* **393**, 197-200.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984): Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **81**, 4776-4780.
- Bezanilla M., Pan A., Quatrano R.S. (2003): RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **133**, 470-74.
- Brandes H., Kende H. (1968): Studies on cytokinin-controlled bud formation in moss protonema. *Plant Physiology* **43**, 827-837.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N6-(D2-isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37-41.
- Burbidge N.T. (1960): The Australian species of *Nicotiana* L. (Solanaceae). *Journal of the Adelaide Botanic Gardens* **8**, 342-380.
- Cove D. (2005): The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* **339**, 339-358.
- Frébortová J., Fraajie M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- Frébortová J., Novák O., Frébort I., Jorda R. (2010): Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant Journal* **61**, 467-481.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Galuszka P., Frébortová J., Luhová L., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2005): Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant and Cell Physiology* **46**, 716-728.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Studies in Natural Products Chemistry* **34**, 203-264.
- Gerhäuser D., Bopp M. (1990): Cytokinin oxidases in mosses. 2. Metabolism of kinetin and benzyladenine in vivo. *Journal of Plant Physiology* **135**, 714-718.
- Goodin M.M., Zaitlin D., Rayapati A., Naidu R.A., Steven A., Lommel S.A. (2008): *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *The American Phytopathological Society (APS)* **8**, 1015-1026.
- Grimsley N.H., Ashton N.W., Cove D.J. (1977): The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics* **154**, 97-100.
- Grimsley N.H., Withers L.A. (1983): Cryopreservation of cultures of the moss *Physcomitrella patens*. *Cryoletters* **4**, 251-58.
- Horstmann V., Huether C.M., Jost W., Reski R., Decker E.L. (2004): Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC Biotechnology* **4**, 13.

- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999): Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal* **17**, 615–626.
- Chen C.M. (1982): In: *Plant Growth Substances*, (Wareing P.F., ed.), Academic, London, 155–163.
- Chu H.M., Ko T.P., Wang A.H.J. (2010): Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyl transferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Research* **38**, 1738–1748.
- John M.C., Amasino R.M. (1988): Expression of an *Agrobacterium* Ti plasmid gene involved in cytokinin biosynthesis is regulated by virulence loci and induced by plant phenolic compounds. *Journal of Bacteriology* **170**, 790–795.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyl transferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009): Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444–449.
- Klämbt D. (1992): In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*, (Kaminek M., Mok D.W.S., Zazimalová E., eds.), SPB Academic Publishing, The Hague, 25–27.
- Knapp S., Chase M. W., Clarkson J. J. (2004): Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon* **53**, 73–82.
- Knight C., Sehgal A., Atwal K., Wallace J.C., Cove D.J., *et al.* (1995): Molecular responses to abscisic acid and stress are conserved between moss and cereals. *Plant Cell* **7**, 499–506.
- Knight C.D., Cove D.J., Cuming A.C., Quatrano R.S. (2002): Moss gene technology. *Molecular Plant Biology* **2**, 285–301.
- Lang D., Zimmer A.D., Rensing S.A., Reski R. (2008): Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* **13**, 542–549.
- Letham D.S. (1973): Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry* **12**, 2445–2455.
- Letham D.S., Palni L.M.S. (1983): The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 163–197.
- Letham D.S. (1994): Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function* (Mok, D.W.S. and Mok, M.C., eds), CRC Press, U.S.A., 57–80.
- Lichtenstein C., Klee H., Montoya A., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Nester E., Gordon M. (1984): Nucleotide sequence and transcript mapping of the *tmr* gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. *Journal of Molecular and Applied Genetics* **2**, 354–362.
- Lindner A.C., Lang D., Seifert M., Podlešáková K., Novák O., Strnad M., Reski R., von Schwartzberg K. (2014): Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2533–2543.
- Macháčková I. (1998): Růst a vývoj: Růstové regulátory. In: *Fyziologie rostlin*. (Procházka, Macháčková, Krekule, Šebánek *et al.*, eds.), Academia, Praha, 253–259.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K.D., Fraaije M.W., Mattevi A. (2004): Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237–1249.
- Miura G. A., Miller C. O. (1969): 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino) purine as a precursor of zeatin. *Plant Physiology* **44**, 372–376.
- Miura G., Hall R. H. (1973): *trans*-Ribosylzeatin. *Plant Physiology* **51**, 563–569.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyl transferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**, 128–138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyl transferases and tRNA isopentenyl transferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 16598–16603.

- Mok D.W.S., Martin R.C. (1994): Cytokinin metabolic enzymes. In: *Cytokinins: chemistry, activity and function*. (Mok D.W.S., Mok M.C., eds.), CRC Press, U.S.A., 129-137.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **255**, 328–333.
- Murai N. (1994): Cytokinin biosynthesis in tRNA and cytokinin incorporation into plant RNA. In: *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. (Mok D.W.S., Mok M.C., eds.), CRC Press, U.S.A., 87–99.
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura T. (2007): Development of series of Gateway Binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* **104**, 34-41.
- Ortiz-Ramírez C., Hernandez-Coronado M., Thamm A., Catarino B., Wang M., Dolan L., Feijó J.A., Becker J.D. (2016): A Transcriptome atlas of *Physcomitrella patens* provides insights into the evolution and development of land plants. *Molecular Plant* **9**, 205–220.
- Powell G.K., Hommes N.G., Kuo J., Castle L.A., Morris R.O. (1988): Inducible expression of cytokinin biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* by plant phenolics. *Molecular Plant Microbe Interact* **1**, 235-242.
- Rensing S.A., *et al.* (2008): The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64–69.
- Reutter K., Atzorn R., Haderl B., Schmulling T., Reski R. (1998): Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in budding and in plastid division. *Planta* **206**, 196–203.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 9972–9977.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 431–449.
- Sawahel W., Onda S., Knight C.D., Cove D.J. (1992): Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Molecular Biology Reporter* **10**, 315–316.
- Schaefer D.G., Zryd J.P., Knight C.D., Cove D.J. (1991): Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics* **226**, 418–424.
- Schaefer D.G., Bisztray G., Zryd J.P. (1994): Genetic transformation of the moss, *Physcomitrella patens*. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering* **V**, 349–364.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241–252.
- Schulte J., Reski R. (2004): High throughput cryopreservation of 140000 *Physcomitrella patens* mutants. *Plant Biol* **6**, 119–27.
- Schulz P.A., Hofmann A.H., Russo V.E.A., Hartmann E., Laloue M., von Schwartzberg K. (2001): Cytokinin Overproducing *ove* Mutants of *Physcomitrella patens* Show Increased Riboside to Base Conversion. *Plant Physiology* **126**, 1224–1231.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Sun J., Niu Q.W., Tarkowski P., Zheng B., Tarkowska D., Sandberg G., Chua N.H., Zuo J. (2003): The Arabidopsis *AtIPT8/PGA22* Gene Encodes an Isopentenyl Transferase That Is Involved in *De Novo* Cytokinin Biosynthesis. *Plant Physiology* **131**, 167–176.
- Swaminathan S., Bock R.M. (1977): Isolation and identification of cytokinins from *Euglena gracilis* transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **16**, 1355–1360.
- Šmídková M., Müller M., Thönes N., Piuko K., Angelisová P., Velemínský J., Angelis K.J. (2010): Transient expression of human papillomavirus type 16 virus-like particles in tobacco and tomato using a tobacco rattle virus expression vector. *Biologia Plantarum* **54**, 451–460.



- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405–26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866–41872.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chemické listy* **98**, 834-841.
- Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D.C., Maule A.J. (2001): Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *N. benthamiana* using a *Potato virus X* vector. *The Plant Journal* **25**, 417-425.
- Van Kast C.A., Laten H. (1987): Cytokinin utilization by adenine requiring mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* **83**, 726–727.
- von Schwartzberg K., Núñez M.F., Blaschke H., Dobrev P.I., Novák O., Motyka V., Strnad M. (2007): Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology* **145**, 786–800.
- Yevdakova N.A., von Schwartzberg K. (2007): Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **226**, 683–695.
- Yevdakova N.A., Motyka V., Malbeck J., Trávníčková A., Novák O., Strnad M., von Schwartzberg K. (2008): Evidence for importance of tRNA-dependent cytokinin biosynthetic pathway in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**, 271–281.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>AtIPT</i>	gen <i>Arabidopsis thaliana</i> isopentenyltransferasa
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BA	benzyladenin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
°C	stupeň Celsia
<i>CaMV35S</i>	promotoru viru mozaiky kvěťáku (z angl. Cauliflower mosaic virus)
CKX	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
Da (kDa)	Dalton (kilodalton)
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DZ	dihydrozeatin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	flavinadenindinukleotid
FastAP	termostabilní alkalická fosfatasa
g	tíhové zrychlení
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. Green fluorescent protein)
GHS-R	receptor růstového hormonu (z angl. Growth hormone secretagogue receptor)
His-tag	histidinová kotva
<i>HlAIPT</i>	<i>Humulus lupulus</i> adenylátová isopentenyltransferasa
HMBDP	1-hydroxy-2-methyl-(E)-butenyl-4-difosfát
iP	isopentenyldenin
iPMP	4-isopropyl-3methylfenol
iPR	isopentenyldeninribosid
IPT	isopentenyltransferasa
kb	kilobáze (tisíc bází)
LB médium	médium zvané jako Lysogenyho vývar (z angl. Lysogeny brot)

M	marker
<i>memT</i>	<i>ortho</i> -methoxytopolin
<i>meoT</i>	<i>meta</i> -ethoxytopolin
MEP	methylerythritol fosfátová dráha
min.	minuty
mol·l <sup>-1</sup>	mol na litr
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
MVA	mevalonátová dráha
nm	nanometr
OD <sub>600</sub>	optická hustota při 600 nm
<i>oT</i>	<i>orto</i> -topolin
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol
P. misky	Petriho misky
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
<i>PpIPT</i>	gen kódující <i>Physcomitrella patens</i> isopentenyltransferasu
PVDF	polyvinyliden difluoridová membrána
rpm	počet otáček za minutu (z angl. rotation per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
TBS	tris pufr (z angl. tris-buffered saline)
TBST	tris pufr s přísávkem Tweenu 20
T-DNA	transferová DNA přenášená Ti-plasmidem
TEMED	tetramethylendiamin
Ti-plasmid	nádor indukující plasmid (z angl. tumor inducing)
<i>Tmr</i>	gen uložený v T-DNA kompartmentu Ti-plasmidu
tNOS	terminátor pro nopalinsynthetasu
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyl transferáza
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>Tzs</i>	gen ulžený ve virulentní oblasti usnadňující přenos T-DNA
<i>uidA</i>	reportérový gen kódující p-glukuronidázu

UV	ultrafialové záření
μl	mikrolitr
VIGS	virem-indukované umlčení genu
WT	divoký kmen (z angl. wild type)